



Institut für Bio- und Nanosystems

Elektrophysiologische Charakterisierung neuronaler Netzwerke von Insekten *in vitro*

Anna Reska

Elektrophysiologische Charakterisierung neuronaler Netzwerke von Insekten *in vitro*

Anna Reska

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4230

ISSN 0944-2952

Institut für Bio- und Nanosysteme

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH, · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden.....	7
2.1.	Zellkultur von Terminalganglion-Neuronen der Grille	7
2.1.1.	Gewebepräparation	7
2.1.2.	Zellentnahme / Zelldissoziation.....	8
2.1.3.	Zellkultivierung.....	8
2.2.	Oberflächenbehandlung	9
2.3.	Herstellung von zellaversiven Substraten mithilfe von PEG.....	9
2.3.1.	Kopplung von linearem NH_2 -PEG auf Gold mittels DTSP	9
2.3.2.	Kopplung von linearem NH_2 -PEG auf Glas mittels APTES.....	10
2.3.3.	Microcontact Printing (μCP) mit Stempeln aus PDMS und POP	10
2.3.4.	Herstellung von Linienmustern mit hoher ConA Konzentration	11
2.4.	Elektrophysiologie	12
2.4.1.	Patch-Clamp-Experimente.....	12
2.4.2.	Auswertung der elektrophysiologischen Daten	14
2.5.	REM Untersuchungen der Zellen	15
2.5.1.	Fixieren der Zellen	16
2.5.2.	Kritisch-Punkt-Trocknen und Sputtern	17
2.6.	AFM	18
2.6.1.	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie).....	18
2.6.2.	AFM –Durchführung	20
2.7.	Versuchslösungen und Pharmaka	21
2.7.1.	Lösungen für die Zellkultur	21
2.7.2.	Lösungen für die Elektrophysiologie	22
2.7.3.	Lösungen für die REM Untersuchungen	22
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Homogene Netzwerke.....	24
3.1.1.	Morphologie der Zellen	24
3.2.	Geometrische Kontrolle des neuronalen Wachstums	26
3.2.1.	Kontrastversuche zur Herstellung strukturierter neuronaler Netzwerke.....	26
3.2.2.	Morphologie der Zellen	41
3.3.	Elektrophysiologie	49
4.	Diskussion	57
4.1.	Qualität der Zellkultur	57
4.2.	Geometrische Kontrolle des Wachstums	58
4.3.	Elektrophysiologie	63
4.4.	Synaptische Verbindungen zwischen Nervenzellen.....	65
5.	Zusammenfassung.....	67
	Abbildungsverzeichnis	69
6.	Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

Grillen haben im Laufe der Evolution ein sehr komplexes sensorisches System entwickelt, das die Detektion und Analyse von Windstößen in unmittelbarer Umgebung des Tieres erlaubt. Dieses so genannte Cerkalsystem besteht aus annähernd 2000 mechanosensorischen Sinneshaaren, die auf zwei kegelförmigen Körperanhängen des Abdomens, den Cerci, angeordnet sind. Die Sinneshaare werden abhängig von Kraft und Richtung des Luftstoßes ausgelenkt und reagieren schon auf Windgeschwindigkeiten von $< 0,03 \text{ mm/s}$ (Shimozawa et al., 2003).

Jedes Haar projiziert seine Informationen über ein sensorisches Afferenzneuron am Sockel der Haarzelle (Gnatzy und Schmidt, 1971) an Projektions- und lokale Interneurone des Terminalganglions (TG) (Heusslein und Gnatzy, 1987; Palka und Olberg, 1977; Westin et al., 1977). Einige dieser Interneurone sind gut untersucht worden und werden als Rieseninterneurone (Giant Interneurone GI) bezeichnet (Edwards und Palka, 1974; Mendenhall und Murphey, 1974; Murphey et al., 1984; Roeder, 1948).

Viele dieser GIs projizieren intersegmental und repräsentieren dabei die Schlüsselemente der Kommunikation und Verarbeitung neuronaler Informationen zwischen den assoziativen Zentren des Gehirns und den sensorischen und motorischen Zentren der Thorakalganglien (Schoch et al., 2005).

Die aufsteigenden Interneurone des Terminalganglions leiten die von den cercalen Rezeptoren perzeptierte Information des Windstimulus zum thorakalen und zu den cephalischen Ganglien weiter, wo das Verhalten der Grille kontrolliert wird. Neurone dieser Ganglien sind beispielsweise für die Koordination von Ausweichbewegungen bzw. Fluchtverhalten zuständig (Gras und Kohstall, 1998). Die aufsteigenden Interneurone im Mesothorakalganglion übernehmen die Funktion der Rückmeldung aus den verschiedenen motorischen Zentren sowie der Meldungen extero- und enterorezeptorischer Informationen des Körpers. Innerhalb des TG wird die Information über die Windstimuli in einfachen Schaltkreisen vorprozessiert bevor sie an höhere Zentren weitergeleitet wird.

Beispielsweise haben segmentale 9-DL Interneurone und 10-3a GI des TG (siehe Abb.1) überlappende rezeptive Felder, reagieren also auf ähnliche Windstimuli. 9-DL Interneurone sind mit den 10-3a GIs so verschaltet, dass sie bei Reizung zu einer zusätzlichen Membrandepolarisation und damit zu einer Erhöhung der Aktionspotential-Frequenz in 10-3a führen.

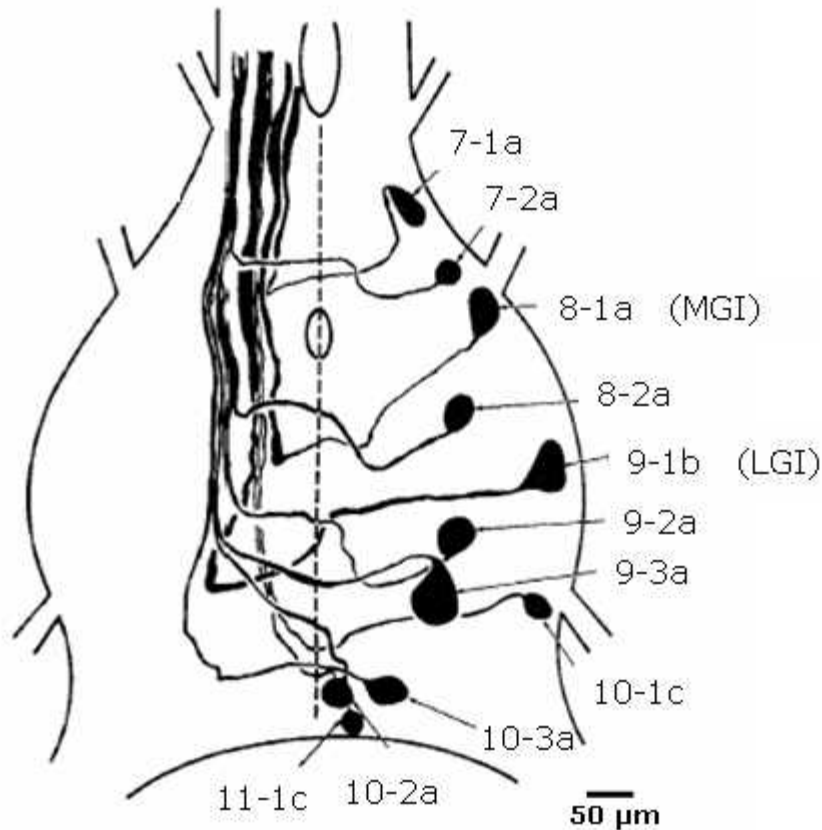


Abb. 1 Schematische Übersicht der Interneurone im Terminalganglion der Grille.
(Quelle: Jacobs und Murphey, 1987)

Die schematische Übersicht der Interneurone zeigt nur Interneurone einer Hälfte des TG, tatsächlich befinden sich Paare der Interneurone symmetrisch auf beiden Seiten. MGI steht für mediale Giant Interneurone und LGI für Lateralen Giant Interneurone.

Im unteren Teil ist das 10-3a Interneuron zu sehen.

Windsensitive lokale non spiking Interneurone, zu denen auch die 9-DL Interneurone gehören, verursachen wahrscheinlich eine Verschiebung der mittleren Orientierungsrichtung, d.h. eine Fluchtbewegung in die entgegengesetzte Richtung der Reizquelle (Gras und Kohstall, 1998).

In der Vergangenheit wurden die meisten Untersuchungen zum neuronalen Schaltkreis des Fluchtverhaltens am intakten Ganglion durchgeführt (Bodnar et al., 1991). Es liegt lediglich eine Arbeit vor, in der Neurone, die am Fluchtverhalten der Grille beteiligt sind, in Zellkultur untersucht wurden (Kloppenburg und Hörner, 1998).

In dieser Arbeit wurden die Neurone eindeutig identifiziert, jedoch waren die Zellen nicht gezielt in Netzwerke eingebunden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Zellen des beschriebenen neuronalen Flucht-Schaltkreises zu untersuchen. Primärzellkulturen sind im Gegensatz zu neuronalen Insektenzelllinien (wie z.B. SF-9) zwar nicht fähig sich zu vermehren, jedoch bleiben viele physiologische Eigenschaften erhalten. Einer der wichtigsten Vorteile einer primären Zellkultur ist die Möglichkeit zur Untersuchung der Zellen ohne störenden Einfluss anderer Neurone. Man kann die gewünschte Zellart bzw. Gewebe wählen und auf seine speziellen Funktionen hin untersuchen. Die einzelnen Zellen sind leichter zugänglich als in Gewebeschnitten oder intakten Geweben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, geometrisch definierte Netzwerke aus Grillenneuronen des TG herzustellen, um so eine gezielte Einbindung von Neuronen in Netzwerken zu ermöglichen.

Dies erfordert die Kontrolle der Zellen über Zellplatzierung und –adhäsion als auch des Neuritenwachstums. Zelladhäsion und Neuritenwachstum kann zum Beispiel durch biochemische und topographische Oberflächenstrukturierung geschehen. So wurden z.B. Schneckenneurone direkt mechanisch auf topographische Lochstrukturen aus SU-8 Photolack positioniert. Einzelne Schneckenneurone wurden mit einer fein ausgezogenen und feuerpolierten Glasmikropipette aus dem Organismus entnommen und direkt auf die gewünschte Position des Substrats platziert (Merz und Fromherz, 2005). Ein solcher Ansatz ist bisher nicht erfolgreich für Insektenzellen verwendet worden. Eine wesentliche Schwierigkeit ist die schnelle Adhärenz der Zellen an das Substrat, so dass eine Korrektur der Position nicht mehr möglich ist.

Bei der Dielektrophorese (DEP) wird anstelle von Mikropipetten ein elektrisches Feld zur Positionierung der Zellen genutzt (Heida et al., 2001). Durch planare quadropole Mikroelektroden wird ein elektrisches Feld erzeugt, dessen Feldstärke zur Mitte hin abnimmt. Die Neuronen werden zwischen den Elektroden ausgesät und nach dem Anlegen einer Spannung von 1-5 V sammeln sich bei der negativen DEP die noch nicht adhären Zellen im Bereich der Mikroelektroden mit der geringsten Feldintensität. Anschließend können die Mikroelektroden zur Stimulation bzw. Aufzeichnung neuronaler Aktivität der positionierten Zellen genutzt werden.

Bei den so genannten *Optical Tweezers* (Ashkin et al., 1987) werden Laserstrahlen im infraroten Wellenlängenbereich zur Positionierung von Zellen verwendet. Man kann die *Optical Tweezers* auch dazu nutzen, neuronale Wachstumskegel zu stimulieren und damit das Neuritenwachstum einer Zelle zu lenken und zu erhöhen. Ein Teil des

Laserstrahl wird überlappend auf den Rand eines aktiven Wachstumskegels einer Zelle gerichtet und langsam in die gewünschte Wachstumsrichtung bewegt. Das Neuritenwachstum findet bevorzugt in die Richtung statt, in die der Laserstrahl auf den Wachstumskegel grenzt (Ehrlicher et al., 2002). Eine neuere Abwandlung dieser Methode basiert darauf, Aktinmonomere im Wachstumskegel eines Neurons an die Stelle zu transportieren, an der das neuronale Wachstum erwünscht ist. Damit kann ein natürlicher Wachstumskegel zum erhöhten Neuritenwachstum stimuliert werden und ein künstlicher Wachstumskegel am Zellsoma induziert werden (Mohanty et al., 2005).

Neben den beschriebenen Methoden zur Kontrolle der Zelladhäsion und des Neuritenwachstums haben sich in der Vergangenheit biochemische Verfahren als zuverlässig erwiesen. Bei diesen Verfahren werden üblicherweise spezielle Adhäsionsmoleküle für die Zellen auf Oberflächen aufgebracht, die typischerweise zellaversive Eigenschaften besitzen. Sanjana und Fuller benutzten zu diesem Zweck einen speziell modifizierten Tintenstrahldrucker. Bei diesem Verfahren, welches *Ink-jet printing* genannt wird, werden mit Hilfe des Tintenstrahldruckers Mikrostrukturen aus kleinen Tropfen von Adhäsionsmolekülen unter maschineller Kontrolle auf die Substratoberfläche aufgebracht (Sanjana und Fuller, 2004).

Als Methode der Wahl für die Herstellung von molekularen Mustern auf Oberflächen hat sich in den letzten 10-15 Jahren das *Microcontact printing* (μ CP) herauskristallisiert. Es wird ein elastischer Stempel verwendet, um Moleküle in definierten Mustern auf Oberflächen zu übertragen (siehe Abb.2). Da diese Verfahren in der vorliegenden Arbeit mehrfach angewendet wurde, befindet sich im Abschnitt 2.3.3. im Material- und Methodenteil eine genauere Beschreibung des Verfahrens.

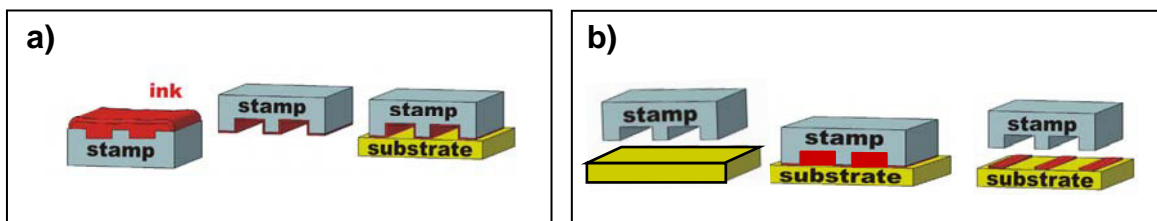


Abb. 2 Softlithographische Methoden zur Erstellung von Mustern (nach Xia und Whitesides, 1998, modifiziert).

a) klassisches μ CP und b) inverses μ CP.

In dieser Arbeit wurde auf Basis des protein- und zellabweisenden Moleküls Polyethylenglykol (PEG) ein Protokoll zur Strukturierung von Oberflächen entwickelt, welches ein gerichtetes Wachstum von neuronalen Zellen der Zweifleckgrille (*Gryllus bimaculatus*) ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Modifikationen von PEG sowie diverse chemische Reaktionen zur Bindung von PEG an Glasoberflächen getestet (siehe Abschnitt 2.3.), wobei die Kombination von Stern-PEG mit Concanavalin A (ConA) zur Bildung von geometrisch definierten Netzwerken aus Grillenneuronen führte (siehe Abschnitt 3.2.1.).

Im Anschluss wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften von strukturierten und unstrukturierten Netzwerken mittels Einzel Patch-Clamp Ableitungen untersucht. Es zeigte sich, dass grundlegende elektrische Eigenschaften vergleichbar waren. Darüber hinaus wurden in Doppel Patch-Clamp Ableitungen erstmalig funktionelle chemische Synapsen in strukturierten neuronalen Netzwerken der Grille gezeigt. Aus solchen strukturierten Netzwerken können zusammen mit bereits bestehenden Erkenntnissen wichtige Aufschlüsse über genaue modulatorische Mechanismen innerhalb von neuronalen Netzwerken gewonnen werden.

Daten über die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen im Terminalganglion sollten sowohl in der herkömmlichen Zellkultur als auch bei Zellen der Netzwerke mit Literaturangaben verglichen werden, um den Einfluss der Zellkulturbedingungen und des Wachstums in vorgegebenen Mustern auf die Vitalität der Zellen beurteilen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur von Terminalganglion-Neuronen der Grille

2.1.1. Gewebepräparation

Die verwendeten Grillen stammen aus einer institutseigenen Grillenzucht. Sie wurden in einem 12 h Tag / Nacht Rhythmus aufgezogen und 1 - 2 Wochen nach der Adulthäutung präpariert. Alle Tiere, die zu Versuchszwecken ausgesucht wurden, hatten zwei intakte Cerci. Vor der Präparation wurde die Grille für 30 - 60 min bei 4°C kaltanästhesiert und anschließend dekapitiert.

Nach der Entfernung aller Laufbeine wurde das Tier mit der Ventralseite nach oben mit Präpariernadeln in einer mit Wachs ausgegossenen Präparierschale fixiert. Mit einer groben Schere wurde am Übergang zwischen Thorax und Abdomen ein tiefer Schnitt quer zur Längsachse des Tieres gesetzt, der zur Durchtrennung der Konnektive zwischen dem letzten Abdominalganglion und dem Prothorakalganglion führte. Anschließend wurde durch zwei Schnitte parallel zur Längsachse unter flacher Schnitfführung die Ventralseite des Abdomens bis nahe der Cerkalbasis geöffnet, nach vorne aufgeklappt und mit Minutiennadeln fixiert. Da bei allen Arthropoden das zentrale Nervensystem ventral liegt, befand sich nun der abdominale Teil des ZNS, d.h. das vierte Abdominalganglion sowie das Terminalganglion im ausgeklappten Bereich des Tieres.

Fett- und Gewebereste wurden mit eiskaltem modifizierten Leibovitz-15 Zellkulturmedium (mL-15) (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.7.1.) abgespült. Während der folgenden Schritte war das Präparat vollständig mit mL-15 überschichtet.

Unter optischer Kontrolle wurden nun mindestens 3 Abdominalganglien und das Terminalganglion unter Durchtrennung sämtlicher Seitenäste und Tracheen aus dem umliegenden Bindegewebe gelöst und in eine Petrischale mit sterilem mL-15 überführt.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen, d.h. es wurden ausschließlich autoklavierte Spitzen, steril filtrierte Lösungen und sterilisiertes Präparationsbesteck benutzt. Außerdem wurde nur mit Handschuhen und unter der Sterilbank gearbeitet.

Der entnommene Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) wurde mehrmals mit sterilem mL-15 gewaschen und in einer mit Sylgaard 184 (Dow Corning) ausgegossenen Präparierschale mit sehr feinen Minutiennadeln jeweils an den beiden Cerkalnerven und am ersten Abdominalganglion festgesteckt.

2.1.2. Zellentnahme / Zelldissoziation

Mit zwei feingeschliffenen Dumontpinzetten wurde die Terminalganglienhülle vorsichtig zuerst ventral und danach dorsal aufgerissen. Reste der Ganglienhülle wurden entfernt und die Tracheen und Cerkalnerven wurden durchtrennt, so dass nur noch die Somata der Zellen in einem Zellverband verblieben.

Das so gehäutete Ganglion wurde zur enzymatischen Zelldissoziation in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß mit 500 µl Collagenase / Dispase-Lösung (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.7.1.) überführt. Die Dauer der Enzymbehandlung betrug 3 Min bei 37°C im Wasserbad. Durch mehrmaliges Triturieren mit einer silikonisierten 200 µl Pipettenspitze wurde der Dissoziationsvorgang mechanisch unterstützt. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurde die Zellsuspension in 10 ml Zwischenmedium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.7.1.) überführt und daraufhin bei 8°C für 5 min mit 1350 g zentrifugiert.

2.1.3. Zellkultivierung

Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren bis auf einige wenige Mikroliter mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in 150 µl mL-15 resuspendiert. Nun konnten die Nervenzellen auf vorbereiteten Oberflächen, welche sich in 3 ml Zellkulturschalen (Greiner) befanden, ausplattiert werden. Je 50 µl der Zellsuspension wurden mittig auf eine Oberfläche pipettiert und anschließend zum Adhärenz bei 29°C im Brutschrank ruhen lassen.

Nach ca. 90 Min wurden die Zellkulturschalen mit 3 ml mL-15 Medium aufgefüllt. Im Laufe von wenigen Stunden begannen die Zellen zu redifferenzieren, d.h. neue Neuriten zu formen und konnten im Verlauf der nächsten Tage elektrophysiologisch untersucht oder anderen Untersuchungsmethoden (wie z.B. REM) zugeführt werden.

2.2. Oberflächenbehandlung

Als Zellkulturoberflächen wurden in der Regel runde Glascoverslips (VWR, Ø = 12 mm) benutzt. Um die Glascoverslips zu reinigen und zu hydrophilisieren, wurden sie in einer 20%-igen H_2SO_4 -Lösung bei 80°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die H_2SO_4 Lösung abgenommen und die Glascoverslips drei Mal mit Aqua bidest. gespült. Ungefähr 100 µl einer ConA - Lösung (100 µg/ml in Aqua bidest.) wurde auf die aktivierten Glascoverslips pipettiert, 1 h Raumtemperatur inkubiert und danach drei Mal mit Aqua bidest. gewaschen, um ungebundene Proteinrückstände zu entfernen.

2.3. Herstellung von zellaversiven Substraten mithilfe von PEG

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde PEG wurde als zellaversives Substrat für die Herstellung eines Mustersubstrates für definiertes Neuronenwachstum getestet. Daher wurden mehrere Protokolle getestet, PEG an Glas- bzw. SiO_2 Oberflächen zu koppeln. Die zellaversiven Eigenschaften der Oberflächen wurden überprüft, indem Grillenneurone für einige Tage auf den Oberflächen kultiviert und anschließend einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen wurden. Als Kontrolle wurden Zellen auf ConA beschichteten Glascoverslips als Standardsubstrat ausgesät. Wuchsen auf dieser Kontrolle keine Zellen, wurde das gesamte Experiment wiederholt.

2.3.1. Kopplung von linearem NH_2 -PEG auf Gold mittels DTSP

Zunächst wurde eine Kopplung von NH_2 -PEG über den Thiollinker DTSP (3,3'-Dithio-bis(propionsäure -hydroxysuccinimidylester, Fluka) an einem mit Gold besputtertem Glascoverslip bzw. SiO_2 -Scheibchen (Oxiddicke ca. 30 nm) getestet.

Dazu wurden ca. 1 mg DTSP in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) gelöst und der Coverslip wurde 10-15 min in dieser Lösung inkubiert, drei Mal mit DMSO gewaschen und im N_2 -Strom getrocknet. Danach wurde eine Lösung aus 2,5 mM NH_2 -PEG in 0,5 M KCO_3 -Puffer für 2 h auf diese Oberfläche aufgebracht und wiederum drei Mal, diesmal mit Aqua bidest. gewaschen (Mayer et al., 2005). Anschließend konnten Zellen auf dieser Oberfläche ausplattiert werden.

Es wurden Oberflächen mit aufgesputterten Streifen aus Gold verwendet, um einen Vergleich zwischen dem Zellwachstum auf NH_2 -PEG gebunden an Gold und auf reinem Glas bzw. SiO_2 anstellen zu können.

2.3.2. Kopplung von linearem NH_2 -PEG auf Glas mittels APTES

Um das NH_2 -PEG mittels APTES an Glascoverslips zu koppeln, wurden zunächst die Coverslips für 20 s im Plasmaofen mit O_2 -Plasma gereinigt und dann in einer 5%-igen APTES Lösung APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma, in Aqua bidest. gelöst) inkubiert.

Danach wurden die Coverslips jeweils fünf Mal mit Aqua bidest. und ein Mal mit 100%-igem Ethanol gewaschen und im N_2 -Strom getrocknet. Nachdem die APTES Oberfläche über Nacht bei 80°C im Ofen ausgehärtet worden war, wurden die Oberflächen in einer Lösung aus 0,1 M Na_2CO_3 und 2,5% Glutaraldehyd mindestens 2 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Glascoverslips dann mit einer 0,5%-igen (w/v) NH_2 -PEG-Lösung bedeckt und mindestens 24 h inkubiert. Vor dem Gebrauch für die Zellkultur wurden die Oberflächen eine Minute lang mit Ethanol gewaschen und zwei Mal mit sterilem Aqua bidest. gespült.

2.3.3. Microcontact Printing (μCP) mit Stempeln aus PDMS und POP

PDMS

Das klassische Microcontact Printing wurde mit dem Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS) durchgeführt (siehe Abb.2). Durch ein photolithographisches Verfahren wurden die gewünschte Strukturen in einen Silizium-Wafer geätzt oder mittels Photolack aufgebracht. In diesen Versuchen wurden Wafer mit dem AZ Negativlack 5214 hergestellt.

Anschließend wurde PDMS (Sylgaard 184, Dow Corning) im Verhältnis 1:10 (w/w) mit dem Katalysator angemischt und im Exsikkator entlüftet.

Die Wafer wurden mit Aqua bidest. gereinigt und mit N_2 getrocknet. Durch 5-minütiges Beschichten mit 2%-iger Natriumdodecylsulfat (SDS) - Lösung wurden die Wafer hydrophilisiert. Anschließend wurden sie mit etwas Aqua bidest. abgespült und nochmals mit N_2 getrocknet. Eppendorfgefäße ohne Deckel und Boden wurden auf

den Wafern so platziert, dass sie möglichst viel vom Muster abdeckten. Sie wurden ca. 1 cm hoch mit flüssigem PDMS befüllt und über Nacht (oder mind. 6 h) bei 60°C im Trockenschrank ausgehärtet. Anschließend wurde die gewünschte Stempelhöhe aufgefüllt und die Stempel nochmals für mindestens 4 h bei 60°C zum Auspolymerisieren in den Trockenschrank gestellt. Die Eppendorfgefäße wurden aufgeschnitten und die Stempel herausgelöst. Die nun fast fertigen Stempel mussten bei 110°C mindestens 1 h im Trockenschrank nachhärten.

Polyolefin (POP)

Als Alternative zu PDMS wurde POP (Affinity VP 8770, Dow Chemicals) zur Herstellung von Stempeln verwendet. Es ist härter und damit robuster als PDMS. POP-Stempel wurden durch *Hot Embossing* hergestellt (Csucs et al., 2003).

Dazu wurden O₂-beschichtete Si-Wafer mit der gewünschten Topographie mittels Gasphasenabscheidung fluorosilanisiert und auf einen Block platziert und auf 180°C erhitzt. Ein Polyolefinrohling (ca. 1 x 1 cm großes Stück einer flachen Folie) wurde dann mit einem definierten Druck auf den Wafer gepresst und so dessen Struktur auf das durch die Hitze formbar gewordene Polyolefin übertragen.

Neben POP wurden auch PDMS Stempel von dem fluorosilanisierten SiO₂ - Wafer abgeformt um die Zellkultur auf den mit beiden Stempelmateriale hergestellten Substraten miteinander vergleichen zu können.

2.3.4. Herstellung von Linienmustern mit hoher ConA - Konzentration

Das sogenannte inverse *Microcontact Printing* (oder *Micromoulding in capillaries* – MIMIC) (siehe Abb.2) beruht darauf, dass als Stempelstrukturen invertierte Muster erstellt werden. Die daraus gegossenen Stempel werden auf die Unterlage aufgesetzt und eine Stempellösung (hier Protein) fließt durch Kapillarkräfte in die Hohlräume der Musterstruktur.

Entsprechend wurden Linienmuster auf diese Weise präpariert und Stempel, wie in Abschnitt 2.3.3., beschrieben angefertigt. Dann wurden die Stempel auf einen sauberen, mit SDS hydrophilisierten Glascoverslip aufgesetzt und eine ConA - Lösung (1 mg/ml) hinzu pipettiert. Um das Protein in den Kanälen zu trocknen wurde der Coverslip mit aufgesetztem Stempel für 30 min bei 60°C in den Trockenschrank

gestellt. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt bevor der Stempel entfernt und die Oberfläche zwei Mal mit Aqua bidest. gewaschen wurde.

2.4. Elektrophysiologie

2.4.1. Patch-Clamp-Experimente

Um die Eigenschaften der Nervenzellen in Zellkultur zu charakterisieren, wurde die Patch-Clamp Technik angewendet. Mit dieser Methode lassen sich das Membranpotential sowie die Membranströme von einzelnen Zellen bestimmen.

Die gemessenen Membranspannungen und auch die Tatsache, ob die Zelle Aktionspotentiale generieren kann, lassen Rückschlüsse auf die Ionenkanalausstattung der Membran und auf die Vitalität der Zelle zu. Einzelzell Patch-Clamp Experimente wurden an einem Stand mit Auflichtmikroskop (Zeiss) durchgeführt. Das Mikroskop befand sich innerhalb eines Faradaykäfigs auf einem vibrationsgedämpften Tisch (Newport). Für die Messungen wurde ein EPC9 Verstärker mit dem Stimulationsprogramm Tida 5.0 von HEKA verwendet. Die Verstärkerköpfe samt Mikropipette wurden während der Messung von Mikromanipulatoren (Luigs&Neumann) gesteuert. Die Doppel Patch-Clamp Experimente wurden an einem ähnlich aufgebauten Stand mit Durchlichtmikroskop (Olympus IX 50), ebenfalls mit einem EPC9 Verstärker der Firma HEKA durchgeführt. (siehe Abb.)

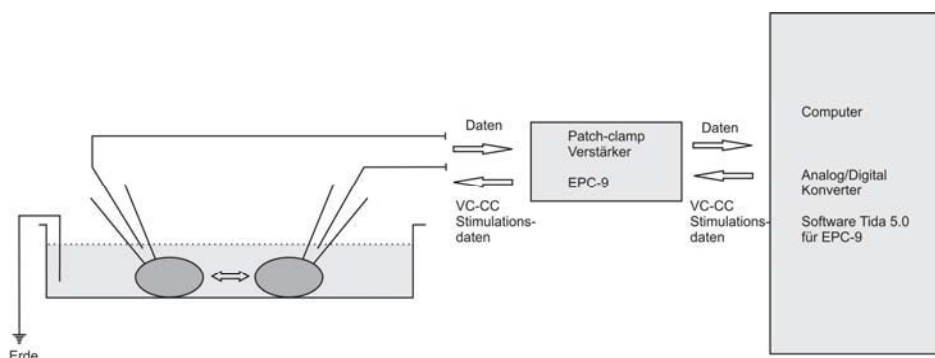


Abb. 3 Schematischer Aufbau des Patch-Clamp Standes. (Quelle: Weigel S.)

Die Zellen befinden sich in einer Zellkulturschale. Der Verstärker empfängt Daten bzw. gibt Stimulationspulse weiter. Je nach Aufbau befindet sich das Objektiv oberhalb (Auflicht-) oder unterhalb (Durchlichtmikroskop) der Zellkulturschale.

Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Messung zwischen 1 und 15 Tagen in Kultur. Sie wurden für die Messung im Zellkulturmedium belassen oder in eine extrazelluläre Patchlösung überführt (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.7.). Die Messungen wurden im *whole-cell* Modus durchgeführt. Die Pipetten aus Borsilikatglas (Sutter Instruments) wurden mit einem Flaming / Brown Mikropipettenpuller (P-97, Sutter Instruments) jeweils unmittelbar vor der Messung gezogen. Der Pipettenwiderstand betrug zwischen 4 und 9 M Ω . Die Pipetten wurden mit intrazellulärer Patchlösung befüllt und über einen chlorierten Silberdraht an den Messkopf angeschlossen.

Vor dem Eintauchen der Pipettenspitze in die Zellkulturschale, in der sich das Substrat mit den Grillenneuronen befand, wurde ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt, damit die Spitze nicht mit Zell- bzw. Membranstücken verstopft. Die Badlösung war über einen chlorierten Silberdraht geerdet.

Die Patchpipettenspitze wurde mit Hilfe des Mikromanipulators möglichst nah an die gewünschte Zelle herangebracht. Durch Ablassen des Überdrucks und ggf. leichten Unterdruck erreichte man den Giga-Seal Modus. Zunächst wurde die Pipettenkapazität kompensiert und eine Klemmspannung von -70 mV angelegt. Als nächstes wurde die Zellmembran unter der Patchpipette durch einen kurzen Unterdruck aufgerissen. Danach wurden der Serienwiderstand und der Membranwiderstand kompensiert. Ebenso die Membrankapazität und der Leckstrom. Das Membranruhepotential der Zellen wurde direkt nach dem Durchbrechen der Zellmembran bestimmt. Anschließend wurde die Zelle im Voltage-Clamp Modus (VC) auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt und anschließend für je 100 ms in 10 mV Schritten auf -30 mV bis 100 mV depolarisiert. Die resultierenden Membranströme wurden aufgezeichnet. Die gemessenen Ströme repräsentieren den Ionenflux durch alle zu diesem Zeitpunkt aktivierten Ionenkanäle.

Anschließend wurde in den Current-Clamp Modus (CC) gewechselt. Dies geschah, um die Zelle auf die Fähigkeit zu testen, Aktionspotentiale zu generieren. Die Zelle wurde dabei auf denjenigen Stromwert geklemmt, bei dem das Membranpotential -70 mV betrug. In 100 pA Schritten wurden Ströme von -0,2 nA bis 1 nA appliziert und die Spannungsänderungen über der Zellmembran bestimmt. Die Pulsdauer betrug 100 ms.

Beim Untersuchen von Netzwerken wurden Zellen ausgesucht, die im Lichtmikroskop offenbar verknüpft waren. Bei den Messungen wurde bei beiden Einzelzellen wie oben beschrieben verfahren. Ebenso wurden CC- und VC - Messung ausgeführt. Zusätzlich wurde ein Programm im CC-Modus mit einem Stimulationsstrom von 0,3–0,5 nA verwendet, bei dem die Zellen auf eine funktionelle Kopplung untereinander

hin geprüft wurden. Dabei wurde immer nur eine Zelle stimuliert und beide Zellsignale simultan aufgezeichnet.

2.4.2. Auswertung der elektrophysiologischen Daten

Für die Auswertung der elektrophysiologischen Daten wurden alle Zellen, deren Membranpotential positiver als -30 mV war, verworfen. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden Zellen, deren Quotient aus Membranwiderstand und Serienwiderstand kleiner als 10 war. Ein zu hoher Serienwiderstand deutet auf eine verstopfte Patchpipette hin. Bei der Erstellung von Strom-Spannungskennlinien wurde das Testpotential gegen die bei dem jeweiligen Potential ausgelöste maximale Stromamplitude des Einwärtsstromes bzw. die mittlere Stromamplitude des Auswärtsstromes aufgetragen.

2.5. REM Untersuchungen der Zellen

Die Untersuchung mit einem Rasterelektronenmikroskop basiert auf der Abtastung der Objektoberfläche mittels eines fein gebündelten Elektronenstrahls. Der Primärelektronenstrahl trifft auf die Probe und löst dabei Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche, die von einem Sekundärelektronendetektor registriert werden. Ein Verstärker erhöht das Signal und leitet es an eine Bildquelle (Computer) weiter. Die Detektion der Sekundärelektronen, die von der Probenoberfläche emittiert werden, gibt dabei Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit und Topologie des Objekts (siehe Abb. 4).

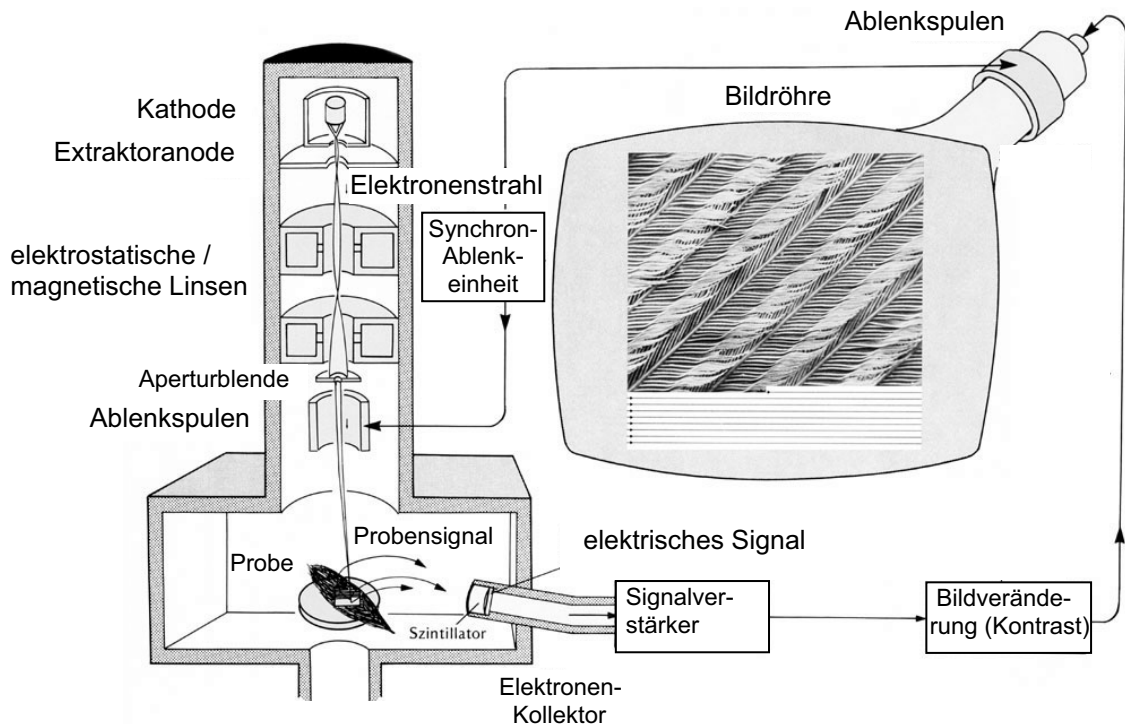


Abb. 4 Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.

Der Primärelektronenstrahl wird durch Feldemission in Richtung der Probe beschleunigt und rastert die Probenoberfläche ab. Die emittierten Sekundärelektronen werden detektiert und als Bild wiedergegeben.

Quelle: Zentrum Mikroskopie der Universität Basel

Bei der Untersuchung mit einem REM ist zu berücksichtigen, dass das erhaltene Bild grundsätzlich nichts mit der optischen Beschaffenheit des Objekts zu tun hat, d.h. dieses Analyseverfahren liefert keine Bilder, die mit lichtmikroskopischen Bildern

vergleichbar wären. Vielmehr erhält man topographische Informationen (Smith und Oatley, 2004). Mit einem Rasterelektronenmikroskop LEO 1550 der Firma Zeiss wurde die Morphologie der kultivierten Grillenneurone untersucht. Um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden, finden die Messungen im Hochvakuum statt. Dies bedeutet, dass die Zellen für die Untersuchung fixiert und entwässert werden müssen, da sie sonst dem Hochvakuum nicht standhalten können.

2.5.1. Fixieren der Zellen

Die Fixierung erfolgte durch sukzessiven Austausch des Zellkulturmediums mit einer 3,5%-igen Glutaraldehydlösung (Sigma) als Fixativ. Die Lösung besaß annähernd die gleiche Osmolarität wie das mL-15. Insgesamt sieben Mal wurde die Hälfte des vorhandenen Mediums in der Zellkulturschale mit der Lösung ausgetauscht, so dass die Konzentration des Glutaraldehyds bis auf ca. 3,5% stieg. In dieser Lösung wurden die Präparate bei 4°C über Nacht fixiert.

Zum Entwässern wurden mit Hilfe von 100%-igem Ethanol p.a. (KMF) nach dem Pipettierschema in Tab.1, ausgehend von einem Gesamtvolumen von 3 ml, die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen für jeweils 10 min eingestellt. Der Entwässerungsschritt in 70%-igem Ethanol erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums weitere Male durch 100%-iges Ethanol ausgetauscht und jeweils 10 min inkubiert, bis das Medium annähernd 100% Ethanol enthielt.

Zielkonzentration	Substitutionsvolumen	Inkubationszeit
25%	0,75 ml	10 min
50%	1,0 ml	10 min
70%	1,2 ml	über Nacht
85%	1,5 ml	10 min
100%	5 x 1,5 ml	10 min

Tabelle 1 Pipettierschema zum Entwässern von Grillenneuronen.

Um in den Zellkulturschalen die in der ersten Spalte eingetragene Konzentration zu erreichen, musste das angegebene Volumen mit 100%-igem Ethanol ausgetauscht werden. Die einzelnen Entwässerungsschritte erfolgten für den jeweils angegebenen Zeitraum.

2.5.2. Kritisch-Punkt-Trocknen und Sputtern

Im nächsten Schritt wurden die Zellsubstrate Kritisch-Punkt getrocknet, um ihnen jegliche Flüssigkeit zu entziehen, erst danach konnte man sie dem Hochvakuum der REM-Probenkammer aussetzen.

Das Prinzip des Kritisch-Punkt-Trocknens basiert darauf, dass es beim Überschreiten des kritischen Punktes eines Mediums, keine Phasengrenze mehr zwischen flüssiger und gasförmiger Phase existiert. Das bedeutet, das Medium befindet sich im überkritischen Zustand (Dykstra, 1992). Die Flüssigkeit verdampft vollständig aus dem Zellmaterial.

Die Kritisch-Punkt-Trocknung erfolgte nach dem von Hoeller (2005) beschriebenen Protokoll. Die Proben-Druckkammer eines Kritisch-Punkt-Trockners (BALTEC CPD030) wurde mit Ethanol befüllt und die Proben wurden vorsichtig ins Kammervolumen überführt.

Nun wurde die Kammer auf 10 °C heruntergekühlt und anschließend das Ethanol schrittweise mit flüssigem CO₂ ausgetauscht. Danach wurde die Kammer auf eine Temperatur von 40 °C erhitzt. Bei einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 73,8 bar war der kritische Punkt für CO₂ erreicht und schlug von flüssig zu gasförmig um, so dass den Präparaten im überkritischen Zustand das restliche Wasser vollständig entzogen werden konnte. Anschließend wurde das Gas kontrolliert abgelassen und die Proben entnommen. Die getrockneten Präparate wurden in einem Sputter Coater (BALZERS SCD004) für 30 Sekunden bei 50 mA mit Gold besputtert, um ihre Oberfläche leitfähiger zu machen. Die mit Gold beschichteten Präparate wurden bis zur Verwendung im Rasterelektronenmikroskop in einem feuchtigkeitsgeschütztem Exsikkator aufbewahrt.

2.6. AFM

2.6.1. Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)

Für die Abschätzung der Topologie der verwendeten Gittersubstrate wurde die Rasterkraftmikroskopie genutzt. Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy; Abkürzung AFM) dient der Abtastung von Oberflächenstrukturen mit Auflösung Nanometerbereich. Diese Methode hat gegenüber der Rasterelektronenmikroskopie den Vorteil, dass sie zur Erfassung sowohl von leitenden und nicht leitenden Oberflächen unter physiologischen Bedingungen geeignet ist.

Eine feine Spitze, die an einer elastischen Blattfeder (Cantilever) befestigt ist, wird mit einer Genauigkeit von bis zu 0,1 nm zeilenweise über die Probenoberfläche geführt. Durch die Topologie der Oberfläche wird diese Blattfeder ausgelenkt und die Auslenkung über ein optisches System detektiert (siehe Abb. 5). Die Kraft zwischen Spitze und Oberfläche setzt sich aus anziehenden (z.B. van der Waals Kraft) und abstoßenden (z.B. Coulombsche Wechselwirkungskraft) Kräften zusammen. Die detektierte Verbiegung wird gemessen und kann in ein Oberflächenbild umgewandelt werden. Zur exakten Bewegung der Spitze über die Probe dienen dreidimensionale piezoelektrische Stallelemente. Die Scangeschwindigkeit liegt um 1 Hz.

Die Verbiegungen des Hebelarms werden hoch aufgelöst gemessen, indem ein Laserstrahl auf die Rückseite des Hebelarms gerichtet und der reflektierte Strahl mit einem Photodetektor registriert wird. Die Verbiegungen des Hebelarms geben Aufschluss über die Oberflächeneigenschaften der Probe. Die geringen Kräfte (ca. 10^{-8} – 10^{-9} N) erlauben auch eine zerstörungsfreie Untersuchung von verhältnismäßig weichen Materialien.

Der Laserstrahl, der auf die Spitze trifft, wird bei vertikaler Bewegung des Cantilevers stärker als die Spitze abgelenkt, dadurch ergibt sich eine hohe Empfindlichkeit senkrecht zur Oberfläche.

Vertikal sind zwei Photodioden angeordnet. Die Spannungsdifferenz der beiden Dioden entspricht einer bestimmten Auslenkung in z-Richtung. Der Krümmungsradius der Spitzen beträgt dabei typischerweise < 10 nm, was je nach Rauigkeit der Probenoberfläche laterale Auflösungen von 0,1 – 10 nm erlaubt.

Ein Controller steuert die Bewegung des Scanners und der Spitze und wertet die Signale aus.

In der Rasterkraftmikroskopie kann sowohl im Contact-Modus, bei dem die Spitze im mechanischen Kontakt zur Oberfläche steht, als auch im Tapping-Modus gearbeitet werden. Im Tapping-Modus erfolgt die Messung dynamisch: ein steifer Cantilever wird durch einen zusätzlichen Piezokristall zur Schwingung angeregt. Als Regelgröße dient hier die Änderung der Schwingungsamplitude.

Das Rasterkraftmikroskop erstellt, anders als bei der zweidimensionalen Messung des REM, ein echtes dreidimensionales Bild des Oberflächenprofils (Binning, 1985, Kollensperger et al., 1999).

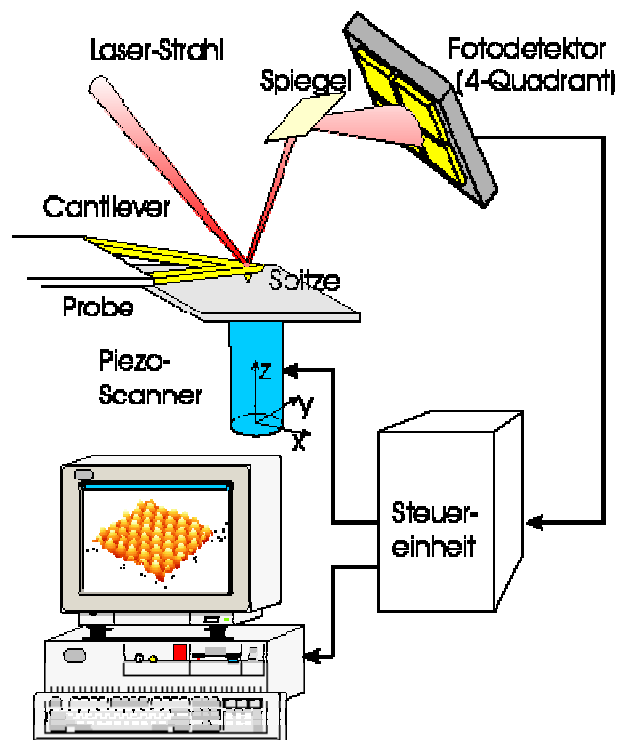


Abb. 5 Schematischer Aufbau eines AFM. (Quelle: Universität Bayreuth)

Die Spitze wandert über die Probe, dabei wird bei jeder topographischen Veränderung der Laserstrahl der auf den Cantilever trifft anders reflektiert und am Fotodetektor in ein Bild umgewandelt

2.6.2. AFM –Durchführung

Da diese Methode nur einen Ausschnitt von $15 \times 15 \mu\text{m}$ der Substratoberfläche erfassen kann, wurde ein eigens dafür hergestelltes Substrat (Abschnitt 3.2.1.4.) vermessen, dessen Muster aus $1 \mu\text{m}$ breiten Streifen in ebenso breiten Abständen bestand.

Die Substrate wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle auf dem Piezoscanner so fixiert, dass sich der Abschnitt des Substrates, der vermessen werden sollte, direkt unterhalb der Messspitze befand. Dann wurde die Probe samt Piezoscanner in einem Faradayschen Käfig mit passiver Schwingungsdämpfung gehängt.

Die erzeugten Topographiebilder wurden anschließend mit Hilfe von Querschnittsanalysen am Bildschirm ausgewertet.

2.7. Versuchslösungen und Pharmaka

2.7.1. Lösungen für die Zellkultur

Alle Chemikalien sind bei Sigma-Aldrich bezogen worden, wenn nicht anders markiert.

Modifiziertes Leibovitz-15 Zellkulturmedium

1,2 ml Mix I (2 g Glucose, 0,8 g Fructose, 0,35 g Prolin und 0,06 g Imidazol in 10ml mL-15)

1,2 ml L-Glutamin

100 µl Gentamycin

ad 100ml mit Leibovitz L-15

pH 7,0 (mit HEPES (Roth) einstellen) bei 29°C

Osmolarität: 360 - 370 mOsmol/l

Zwischenmedium

1,2 ml Mix I (siehe Zellkulturmedium)

1,2 ml L-Glutamin

100 µl Gentamycin

0,28 g Hefeextrakt

0,28 g Lactalbuminhydrolysat (Fluka)

ad 100ml mit Leibovitz L-15

pH 7,0 (mit HEPES einstellen)

Osmolarität: 360 - 370 mOsmol/l

Zusammensetzung der Collagenase-Dispase Lösung

100 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

200 mg Dispase (Roche)

50 mg Collagenase (Gibco)

pH 7,0 (mit HEPES einstellen)

Osmolarität: ca. 300 mOsmol/l

2.7.2. Lösungen für die Elektrophysiologie

Intrazelluläre Patchlösung

KCl 150 mM

CaCl₂ 1 mM

MgCl₂ 6 mM (Roth)

Na₂-ATP 5 mM

EGTA 11 mM

HEPES 10 mM

pH 7,0 (mit KOH einstellen)

Osmolarität: 390 mOsmol/l (mit Glucose/Fructose)

Extrazelluläre Patchlösung

NaCl 150 mM (Merck)

KCl 4 mM (Merck)

CaCl₂ 1 mM (Roth)

D-Glucose 5 mM

HEPES 10 mM

pH 7,0 (mit NaOH einstellen)

Osmolarität: 390 mOsmol/l

2.7.3. Lösungen für die REM Untersuchungen

Fixierlösung

20 mM HEPES (0,36 g / 100 ml)

3,5 % Glutaraldehyd (50% wt)

einige mg Phenolrot

5-6 Tropfen 1 M NaOH hinzugeben, bis pH annähernd dem des Kulturmediums entsprach

ad 100 ml Aqua bidest.

3. Ergebnisse

Um ein Musterwachstum in die Zellkultur zu induzieren, wurden im Verlauf dieser Arbeit verschiedene Versuche unternommen, lineare PEG-Modifikationen auf unterschiedlich vorbehandelte Oberflächen aufzubringen.

Da diese Versuche keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten, wurde in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Wollforschungsinstitut der RWTH - Aachen von einer neuen PEG-Modifikation, dem Stern-PEG Gebrauch gemacht. Dieses sechssarmige PEG-Polymer mit funktionellen Seitengruppen wurde auf Aminosilan aktivierten Oberflächen aufgebracht (Groll et al., 2005).

Um ein geeignetes Musterherstellungsprotokoll zu entwickeln, wurde die Idee des *Microcontact printing* (μ CP) aufgegriffen. Es musste eine zellfreundliche Proteinschicht auf dem aversiven Substrat immobilisiert werden.

Da ConA sich als zellattraktiv herausgestellt hatte, wurde dieses Protein mittels μ CP auf die Stern-PEG Schicht aufgedruckt. Freie Isocyanatgruppen des Stern-PEGs ermöglichen die kovalente Bindung mit dem aminoterminalen Ende eines Proteins.

Es wurden lichtmikroskopische Bilder erstellt, um die Diversität der Zelltypen und ihre Morphologie zu demonstrieren (siehe 3.1.1.). Die elektrophysiologischen Experimente, die im Material- und Methodenteil beschrieben wurden, dienten der Charakterisierung der Zellkultur. Sie wurden sowohl an Einzelzellen als auch homogenen bzw. induzierten Netzwerken durchgeführt. Darüber hinaus erweiterten REM-Untersuchungen die Möglichkeiten der Charakterisierung in Bezug auf das Wachstum der Zellen. AFM Messungen erlaubten zudem eine Oberflächencharakterisierung der hergestellten Substrate.

3.1. Homogene Netzwerke

Als homogen werden in dieser Arbeit Netzwerke bezeichnet, die sich in der Zellkultur ohne äußeren Einfluss bilden. Es zeigten sich vielfältige Formen und Verknüpfungen der einzelnen Neuronen gezeigt, welche nicht eindeutig bestimmten Zelltypen bzw. Morphologien zugeschrieben werden konnten. Es kam auch häufig vor, dass sich nebeneinander liegende Zellen zwar sehr nah kamen, aber keine morphologische oder funktionelle Verknüpfung entstand.

3.1.1. Morphologie der Zellen

Um den Zustand der Zellen zu beurteilen, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der homogenen Netzwerke erstellt. Zellen, die als morphologisch intakt beurteilt wurden, konnten zusätzlich elektrophysiologisch untersucht werden, um auch ihre physiologische Vitalität zu belegen und sie ggf. zu klassifizieren.

3.1.1.1. Lichtmikroskopie

Die folgenden Abbildungen zeigen Grillenneurone aus dem Terminalganglion, die jeweils zwischen 2 und 15 Tagen bei 29°C in mL-15 kultiviert worden waren.

Es konnten Zellen mit unipolaren, bipolaren und multipolaren Neuritenbäumen beobachtet werden. Die Somagrößen variierten zwischen 10 und 100 µm. Die Zelle in Teilabbildung 6 a) hat einen sehr dicken Neurit und einen zweiten, der reich verzweigt ist. Sie ist bipolar. Das Neuron in Teilabb. 6 b) ist multipolar. Es hat mindestens 6 Ausläufer und es ist nicht genau zu erkennen, welcher Ausläufer Dendrit und welcher Axon ist. 6 c) ist ein unipolares Neuron

Die morphologische Vielfalt der Zellen spiegelte sich auch bei der spontanen Ausbildung von homogenen Netzwerken wider. In Abb. 7 sind zwei Beispiele hierfür gezeigt. Während in Abb. 7 a) der Kontakt zwischen den Zellen vermutlich über die Neuriten hergestellt wurde, fand in Teilabbildung 7 b) der Kontakt direkt über die Zellkörper statt.

Homogene Netzwerke bildeten sich in Zellkultur, je nach Lage zu anderen Zellen, bereits nach wenigen Tagen. Ob sie auch physiologisch verknüpft waren, ließ sich nur mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen feststellen.

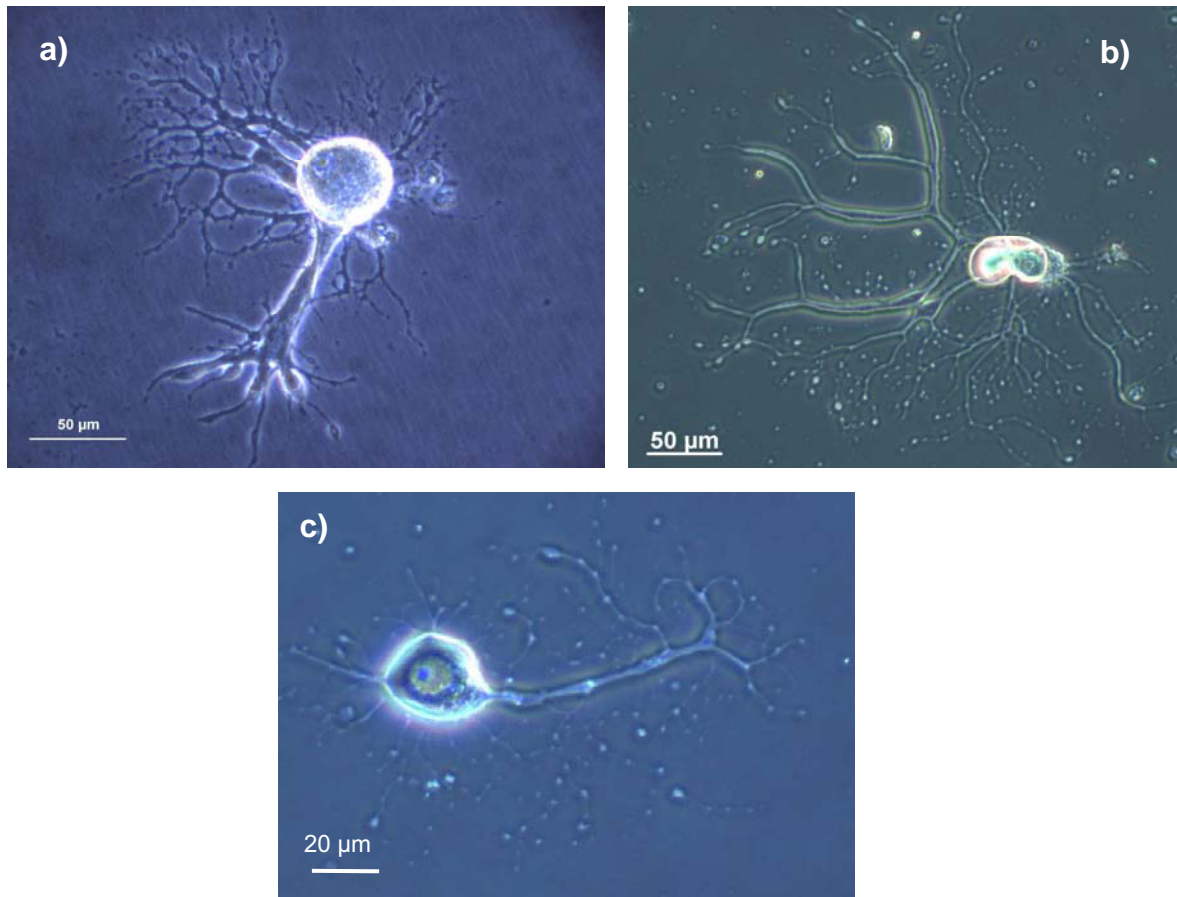


Abb. 6 Grillenneurone auf ConA DIV 7 / bzw. DIV 8.

Die Morphologie der Neurone ist: a) bipolar, b) multipolar, c) unipolar.

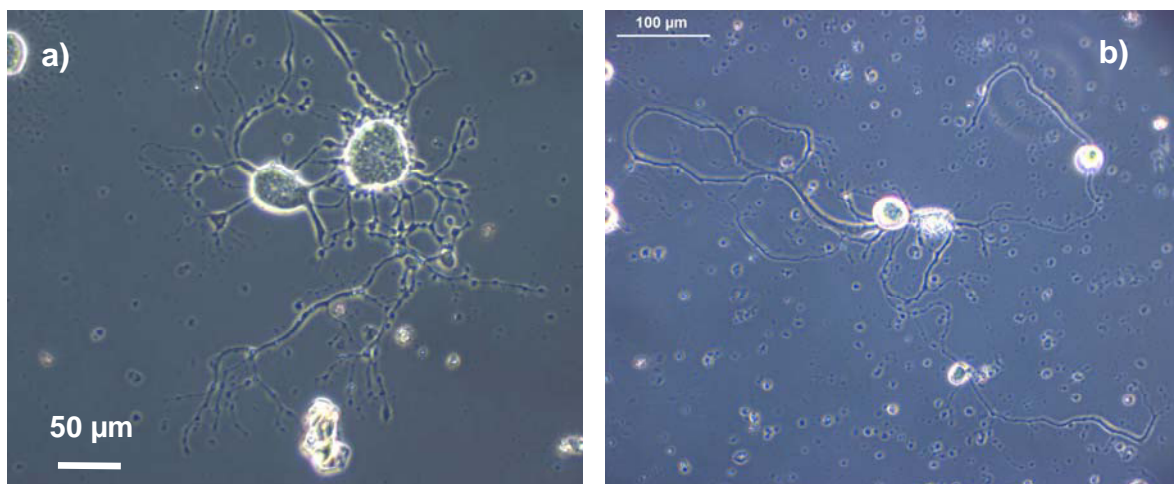


Abb. 7 Homogene Netzwerke von Grillenneuronen.

a) DIV 16, Beschichtung: ConA.

b) DIV 12, Beschichtung: Laminin.

3.2. Geometrische Kontrolle des neuronalen Wachstums

Zur Herstellung strukturierter neuronaler Netzwerke bedarf es eines hohen Kontrastes zwischen zellattraktivem und zellaversivem Oberflächenmaterial. Beispielsweise kann in neuronalen Zellkulturen des Rattencortex eine geometrische Kontrolle des Zellwachstums der zellrepulsiven Wirkung von Polystyrol in Kombination mit der zellattraktiven Mischung aus Poly-L-Lysin und ECM-Gel erzielt werden (Vogt, 2003).

3.2.1. Kontrastversuche zur Herstellung strukturierter neuronaler Netzwerke

Ausgangspunkt für so genannte Kontrastversuche war die Beobachtung einer Zelle, deren Ausläufer sich an einer rund geformten Struktur auszurichten schienen. Vermutlich hatte sich beim Beschichten (siehe 2.2.) eine Blase der ConA - Lösung auf dem Glascoverslip gebildet und war nach einiger Zeit kreisförmig eingetrocknet. Eine Zelle, die zufällig in der Nähe adhärierte, bildete ihre Ausläufer entlang dieser Struktur mit einer höheren ConA - Konzentration (Abb. 9). Dies deutete darauf hin, dass die Zelle eine höhere Affinität zum ConA als zur Glasunterlage hatte.

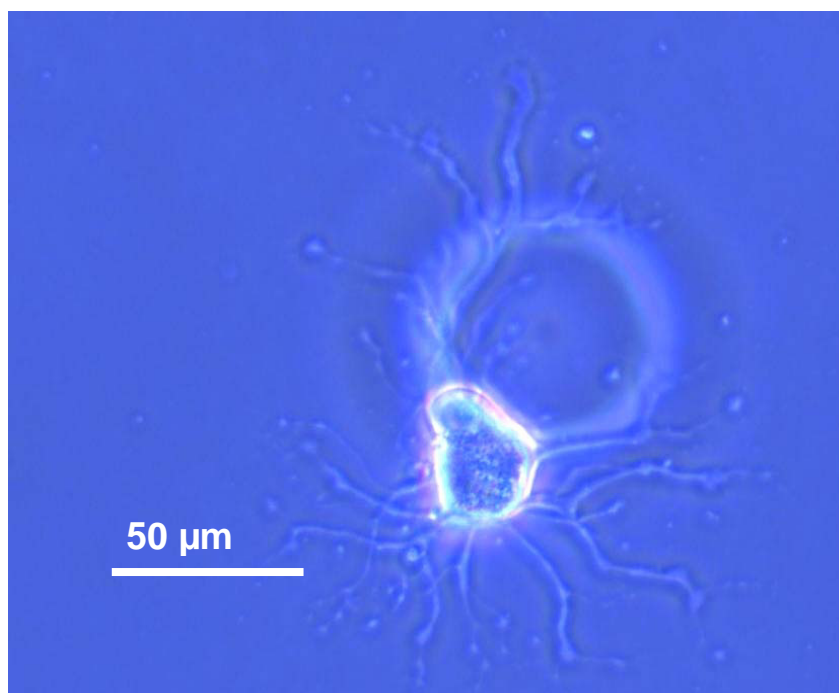


Abb. 8 Grillenneuron auf einem ConA - beschichteten Glascoverslip (DIV 8).

Die Neuriten folgten einem zufällig entstandenem ConA - Gradienten.

In folgenden Experimenten wurden mittels inversem μ CP Gradienten aus ConA auf Glasoberflächen hergestellt und auf ihre Fähigkeit, Neuriten anzuziehen, getestet.

Die Gradienten wurden wie in Abschnitt 2.3.4. beschrieben hergestellt. Die ConA - Lösung enthielt 2 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma - Aldrich). Dieser blaue Farbstoff bildet mit hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe und macht sie so im Lichtmikroskop sichtbar (Bradford, 1976). Die ausplattierten Zellen wurden nach 5-8 Tagen mikroskopiert.

Die Ausläufer der Zellen, die sich in der Nähe der Linien mit hoher ConA - Konzentration befanden, wuchsen entlang der vorgegebenen Struktur (Abb. 10 und 11). Dabei zeigte sich, dass die Ausläufer sich an den Bereichen mit maximaler ConA - Konzentration orientierten.

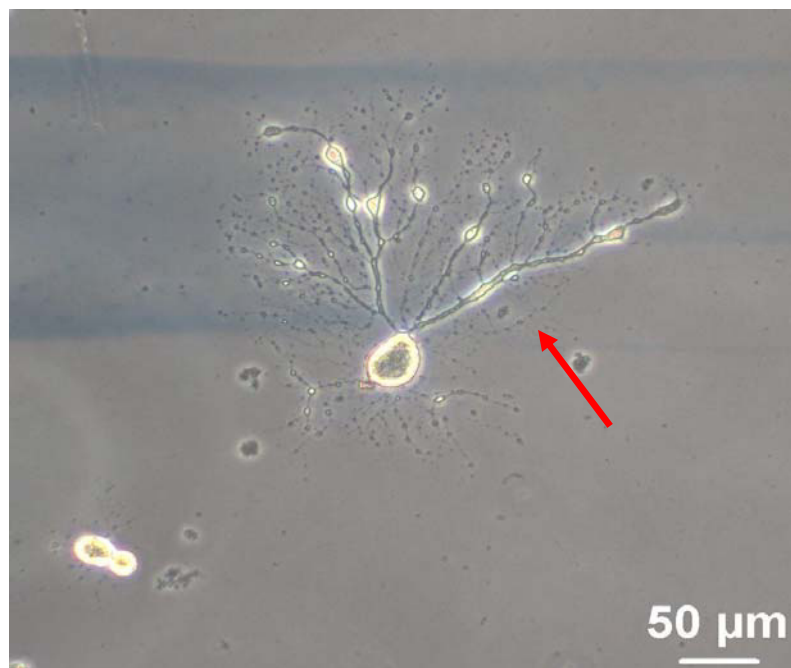


Abb. 9 Grillenneuron auf ConA - Brilliant Blue Linienmuster (DIV 7).

Der mit einem Pfeil gekennzeichnete Neurit richtete sich entsprechend der maximalen ConA - Konzentration aus.

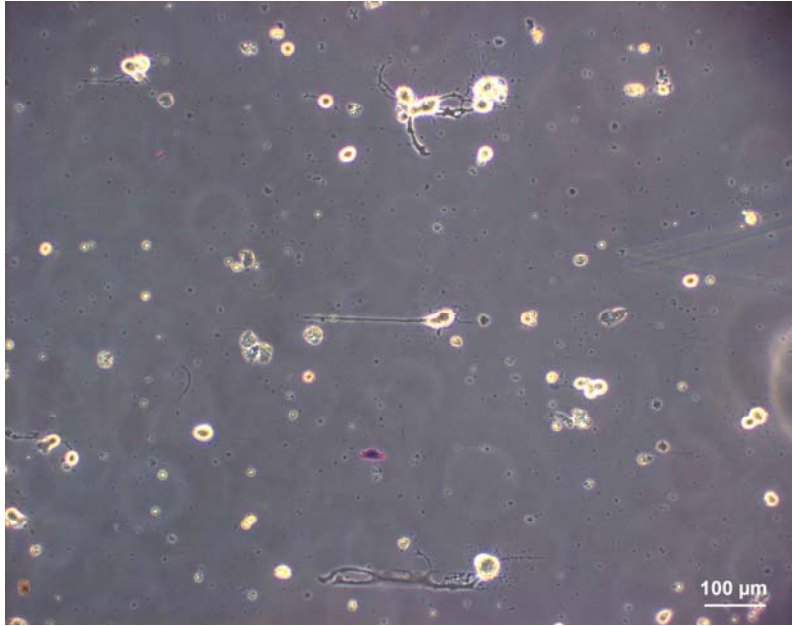


Abb. 10 Grillenneurone auf ConA - Brilliant Blue Streifenmuster (DIV5).

Die Ausläufer der Zellen, deren Zellkörper auf den ConA - Streifen adhärten, wuchsen entlang der Streifen mit der maximalen ConA - Konzentration.

Um sicher zu gehen, dass die Affinität der Ausläufer entlang der vorgegebenen Linienstrukturen nicht auf einen Effekt des beigemengten Brilliant Blue zurückzuführen war, wurden Kontrollversuche mit reinem Brilliant Blue durchgeführt. Es wurden nach der gleichen Methode Linienmuster aus reinem Brilliant Blue erstellt und Zellen auf den Oberflächen ausplattiert. Bei diesem Experiment zeigten die Zellen keine Affinität zu den aufgestempelten Linienmustern.

Die Abb. 11 zeigt Grillenneuronen, die innerhalb eines ConA - Streifens, der auf eine Stern-PEG Oberfläche gestempelt wurde, adhärten. Auch auf diesen Oberflächen schien sich das Neuritenwachstum an den Bereichen mit hoher ConA - Konzentration zu orientieren. Die Neuriten wuchsen am Streifenrand entlang, wo die ConA - Konzentration besonders hoch war (siehe auch Abschnitt 3.2.3.1., AFM). Der Neurit der Zelle, die in Abb. 11 b) gezeigt ist wechselte mehrfach die Streifenseite.

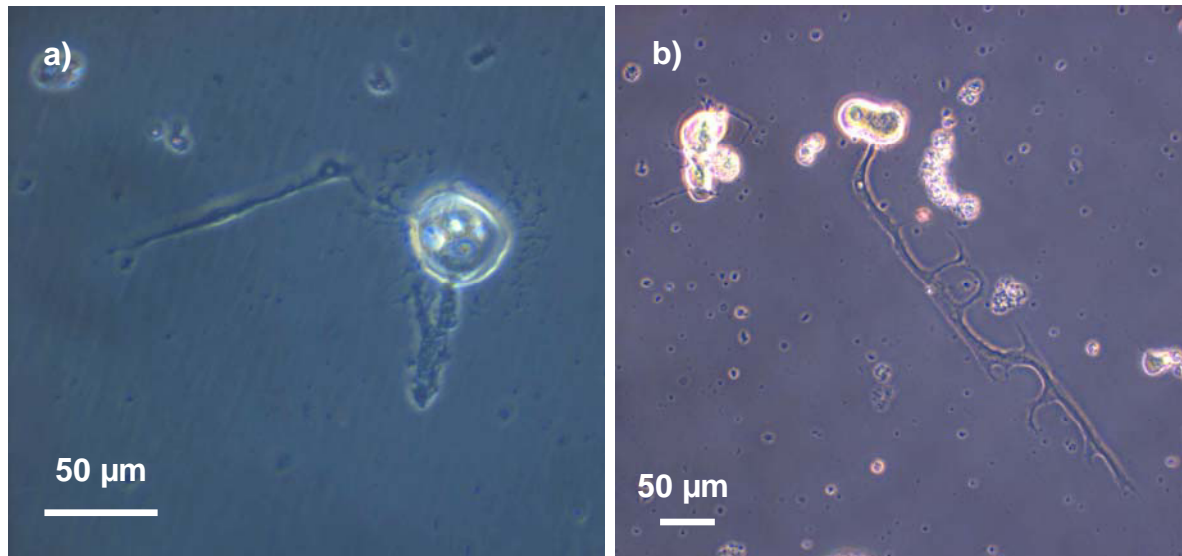


Abb. 11 Grillenneuron auf ConA - Streifen (DIV 7 bzw. DIV 5).

50 µm breite Streifen aus ConA wurden mittels inversem µCP auf Glas aufgebracht. Der nach links wachsende Neurit der Zelle in Abb. 11 a) richtete sein Wachstum am Rand eines ConA - Streifens aus, der nach unten wachsende Neurit orientierte sich nicht an der Streifenstruktur. Der Neurit der Zelle in Abb 11 b) wuchs innerhalb eines ConA - Streifens aus und orientierte sich dabei hauptsächlich an den Rändern des Streifens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Strukturierung vom zellaversiven PEG auf Oberflächen getestet, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.2.1.1. Kopplung von linearem NH₂-PEG über DTSP

Es wurde versucht, lineares Amino-PEG mit Hilfe des Thiollinkers DTSP an eine Goldoberfläche zu koppeln (siehe Abschnitt 2.3.1.) Dabei wurde die Idee verfolgt, das lineare Amino-PEG über den Linker nur an die mit DTSP modifizierte Goldoberfläche zu koppeln, während die Streifen aus SiO₂ PEG-frei bleiben sollten. Es wurde DTSP in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) gelöst und der Coverslip wurde 10-15 min mit dieser Lösung inkubiert, anschließend wurde in einer Lösung aus 2,5 mM NH₂-PEG (in Kalium-Puffer) inkubiert. Die auf diesen Oberflächen ausplattierten Zellen sind in den Abbildungen 12 und 13 zu sehen.



Abb. 12 Grillenneurone auf Streifen aus NH₂-PEG auf Gold bzw. SiO₂ (DIV 2).

Die Zellsomata adhärten überwiegend auf den PEG-freien Streifen, während die Neuriten dazu tendierten, auf den NH₂-PEG-Streifen zu wachsen.

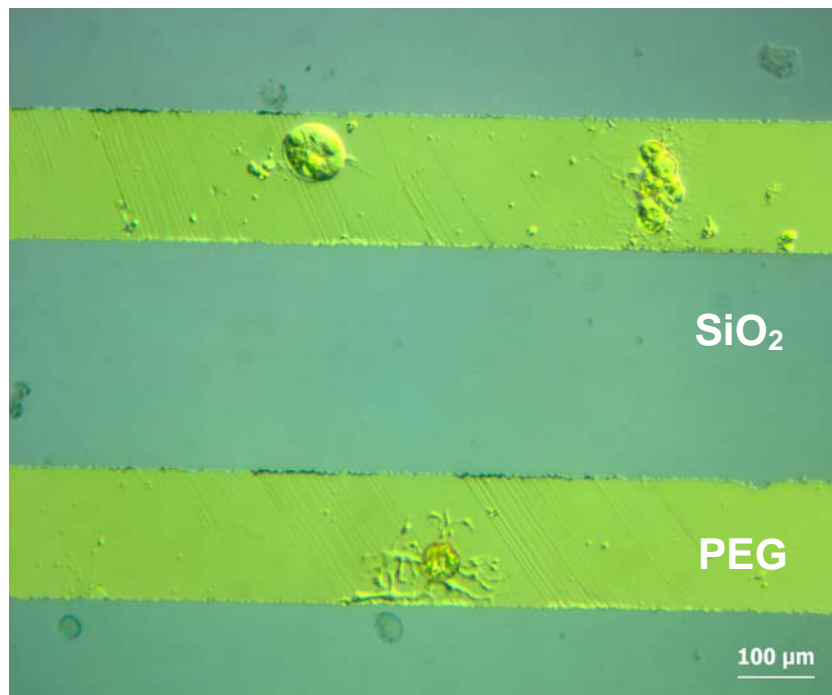


Abb. 13 Grillenneurone auf Streifen aus NH₂-PEG auf Gold bzw. SiO₂ (DIV 2).

Auf diesem Substrat adhärten die Zellsomata überwiegend auf den NH₂-PEG-beschichteten Streifen. Auch die Neuriten wuchsen nur innerhalb des Bereiches mit NH₂-PEG Beschichtung.

Die Ergebnisse zur linearem NH_2 -PEG-Strukturierung mit Hilfe von strukturierten Goldoberflächen waren uneindeutig. Auf einigen Substraten adhärten die ausgesäten Zellen überwiegend auf den NH_2 -PEG-Streifen, jedoch schienen ihre Neuriten eine gewisse Affinität zu diesen Bereichen zu haben (siehe Abb. 12). Auf manchen Substraten waren sogar Zellen zu sehen, deren Wachstum überraschenderweise innerhalb der NH_2 -PEG-Streifen begrenzt war (siehe Abb. 13). Auf den Kontrollen mit vollständiger NH_2 -PEG Beschichtung war die Zelldichte relativ hoch, was den Schluss zuließ, dass diese Art der NH_2 -PEG-Beschichtung nicht vollständig aversiv für die Zellen war.

3.2.1.2. Kopplung von linearem NH_2 -PEG mittels APTES

Für die Kopplung von NH_2 -PEG mittels APTES an Glascoverslips wurden die Oberflächen nachdem sie im Plasmaofen gereinigt und hydrophilisiert worden waren, in einer 5%-igen APTES Lösung (in Aqua bidest.) inkubiert. Danach wurden sie mit Aqua bidest. und 100%-igem Ethanol gewaschen und im N_2 - Strom getrocknet.

Nach dem Aushärten des APTES über Nacht bei 80°C wurden die Oberflächen zuerst mit einer 2,5%-igen Glutaraldehyd-Lösung (in 0,1 M Na_2CO_3) und anschließend mit einer 0,5%-igen NH_2 -PEG - Lösung bedeckt. Nach 24 h konnten die Oberflächen für die Zellkultur genutzt werden.

Die Aversität der Grillenneurone zu Amino-PEG beschichteten Oberflächen konnte nicht 100%-ig belegt werden, da auf den Substraten viele Neurone adhärten und auswuchsen.

Insgesamt waren die Ergebnisse zur geometrischen Kontrolle des Zellwachstums mit Hilfe von linearem NH_2 -PEG nicht zufrieden stellend. Es zeigte sich keine deutliche Begrenzung des neuronalen Wachstums.

3.2.1.3. Kopplung von ConA auf Stern-PEG

Wie bereits beschrieben erwies sich ConA als ein gutes zelladhäsions- und wachstumsförderndes Protein. Für die Herstellung eines möglichst starken Kontrastes galt es nun ein Untergrundsubstrat finden, welches zellaversiv war aber dennoch das strukturierte Aufbringen von ConA erlaubte.

Lineares NH_2 -PEG hatte sich als partiell zellaversiv herausgestellt. Außerdem bestand keine Möglichkeit, die zellattraktive Wirkung von ConA mit der partiell zellaversiven Wirkung von linearem NH_2 -PEG zu kombinieren. Daher wurde eine neue Modifikation von PEG, das Stern-PEG getestet. Diese Modifikation des Stern-PEG bietet aufgrund funktioneller Gruppen vielfältige Möglichkeiten, Moleküle wie z.B. ConA spezifisch zu binden. Um die Zellaversivität des Stern-PEG zu überprüfen, wurden Grillenneurone auf vollständig mit Stern-PEG beschichteten Oberflächen ausplattiert. Es konnte weder Adhäsion noch Zellwachstum beobachtet werden.

Herstellung von Stern-PEG Oberflächen (nach Groll, 2004)

Glascoverslips (\varnothing 17,5 mm) wurden in einem Ultraschallbad gereinigt, für je eine min in Aceton (KMF), Wasser und 2-Propanol (KMF) gewaschen und anschließend im N_2 -Strom getrocknet. Mit einer 40W UV-Lampe wurden die Oberflächen unter einem konstanten O_2 -Strom für ca. 10 min ozonaktiviert. Als nächstes wurden sie in eine Glovebox mit N_2 -Atmosphäre (Unilab, MBraun) überführt und für 2 h in eine Lösung aus 0,3 ml N-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]ethylendiamin (Aminosilan, Sigma-Aldrich) in 50 ml trockenem Toluol getaucht. Nach dieser Aminosilanisierung wurden die Oberflächen mehrmals mit trockenem Toluol gewaschen.

100 mg Isocyanat funktionalisierte PEG Sternpolymere (12.000 g / mol, SusTech) wurden mit 1 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF, Fluka) und 9ml Wasser gemischt. Nach einer Vorvernetzungszeit von 5 min wurden die Polymere mittels Spin Coating (40 s, bei 2500 rpm) auf die Oberfläche aufgebracht. Die Luftfeuchtigkeit genügte für die Kreuzvernetzungsreaktion (siehe Abbildung 11).

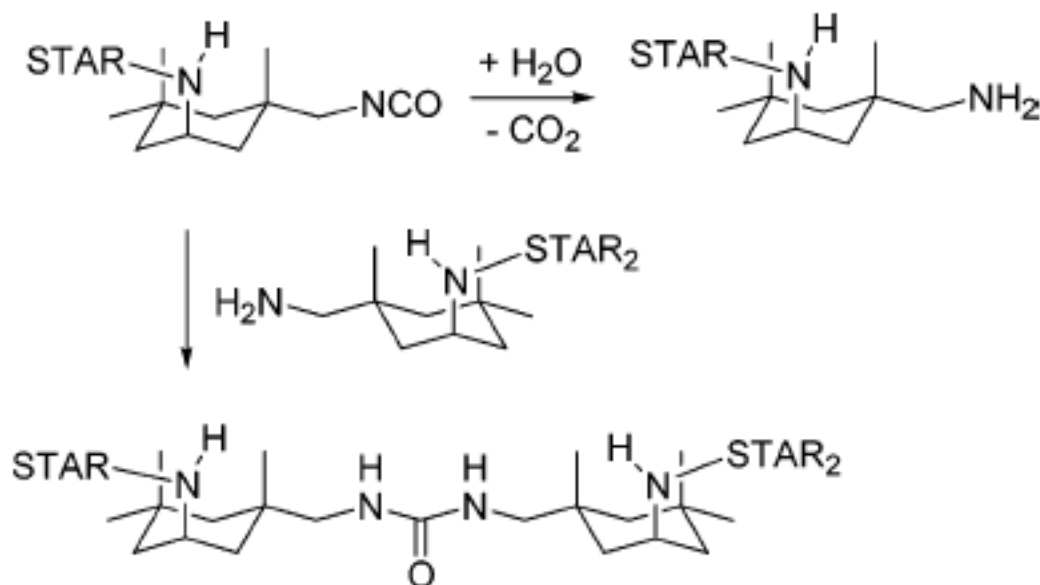


Abb. 14 Kreuzvernetzungsreaktion von Stern-PEG Molekülen in wässriger Umgebung.

Die Isocyanatgruppe reagiert in Gegenwart von Wasser zu einer Aminogruppe, die ihrerseits mit einer anderen Isocyanatgruppe zu einer biokompatiblen Harnstoffbindung reagiert.

Kontrastversuche mit Stern-PEG

Zunächst wurde versucht, Poly-L-Lysin (PLL) an die auspolymerisierten Stern-PEG Oberflächen mittels Glutaraldehyd zu koppeln.

Dazu wurden die ausgehärteten Stern-PEG Oberflächen in 2,5% Glutaraldehyd (0,1 M Na_2CO_3) für 3 h vollständig bzw. mit inverser μCP Technik (Abschnitt 2.3.4.) inkubiert. Die Stempel mit Streifenmustern von 50 bzw. 100 μm Breite wurden mit 10%-iger SDS-Lösung vorbehandelt. Anschließend wurden die Oberflächen für 1 h mit Poly-L-Lysin überschichtet, um dieses an das aufgestempelte Glutaraldehyd zu binden.

Nachdem die Oberflächen drei Mal mit Aqua bidest. gewaschen wurden, wurden sie mit Grillenneuronen besät. Das PLL war zur Visualisierung mit Fluoreszen-thioisocyanat (FITC) gekoppelt.

Auf den Oberflächen mit Glutaraldehyd-Beschichtung waren nur wenige Zellen zu finden. Offenbar war die Kopplung vom Glutaraldehyd an Stern-PEG nicht erfolgreich, so dass die Oberfläche aversiv für die Zellen blieb. Glutaraldehyd war folglich nicht als Linker geeignet. Auf den ConA - Kontrollen adhärten und wuchsen die Zellen wie gewohnt. Anschließend wurden drei verschiedene Strategien parallel verfolgt.

Ansatz 1: Stern-PEG Lösung (noch nicht auspolymerisiert) wurde ConA - Molekülen vermischt.

Ansatz 2: ConA - Lösung wurde mittels μ CP auf frische PEG-Sternmoleküle gestempelt (5 min Stempelinkubation, 10 bzw. 20 min Stempelzeit).

Ansatz 3: ConA wurde mittels des Linkers Disuccinimidyl Glutarat (DSG) an das Stern-PEG gekoppelt. 0,05 mM DSG in DMSO gelöst.

Bei Ansatz 1 und 3 adhärten zwar einige Zellen auf den Substraten, wuchsen aber nicht aus. In Ansatz 2 adhärten die Zellen streifenweise (Abb. 15) und wuchsen nach einigen Tagen auch innerhalb definierter Streifen aus (Abb.6). Daher wurde dieser Ansatz in anschließenden Experimenten weiterverfolgt.

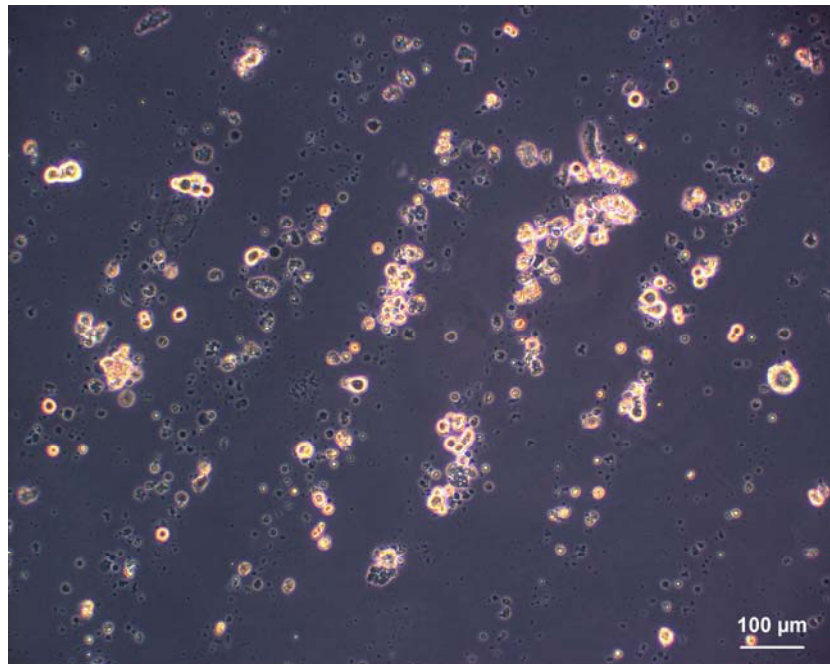


Abb. 15 Streifenmuster (100 µm breit mit 100 µm Abstand) aus ConA auf Stern-PEG, aufgebracht mittels µCP (DIV 1).

Die ausgesäten Grillenneurone adhärten bereits nach wenigen Stunden vorwiegend auf den ConA - Streifen.

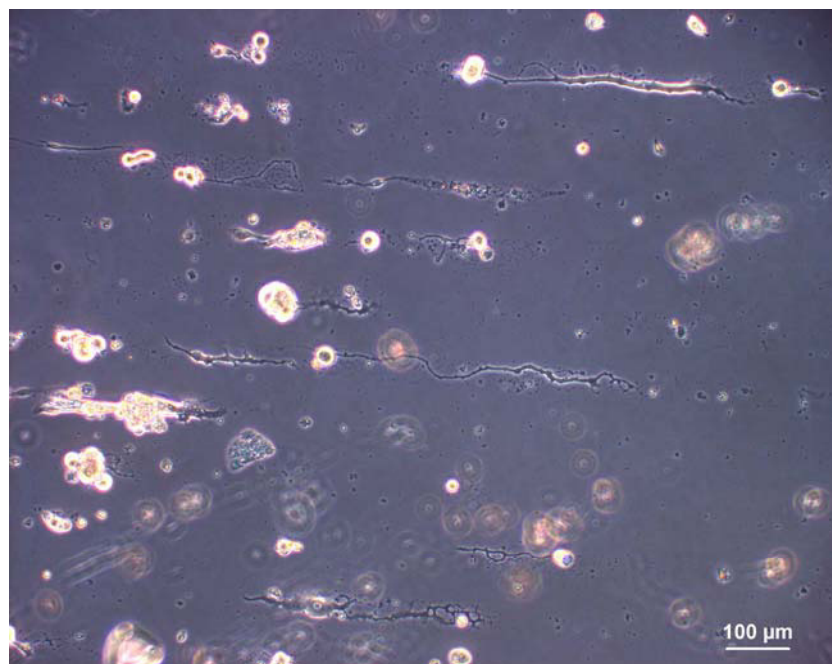


Abb. 16 Streifenmuster (50 µm breit mit 50 µm Abstand) aus ConA auf Stern-PEG, aufgebracht mittels µCP (DIV 6).

Nach einigen Tagen in Zellkultur bildeten die Neurone Neuriten aus, welche die ConA - Streifen nicht verließen.

Experimente zur Kopplung von ConA an Stern-PEG

Es wurden Stern-PEG Oberflächen wie zuvor beschrieben hergestellt. (siehe „Herstellung von Stern-PEG Oberflächen“ diesem Abschnitt) und für 2 h auspolymerisiert. PDMS Stempel (siehe Abschnitt 2.3.3) wurden 10 min in einer ConA – Lösung 1 mg/ml inkubiert, anschließend vorsichtig im N₂-Strom getrocknet und für 10 bis 20 min mittig auf die noch nicht vollständig ausgehärtete PEG-Oberfläche platziert.

Während dieser Zeit konnten verbliebene Isocyanatgruppen mit den Aminoresten des ConA reagieren. Danach wurde der Stempel abgenommen und die Oberflächen zum Auspolymerisieren über Nacht bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag konnten die Oberflächen, nachdem sie mehrmals mit sterilem Aqua bidest. gewaschen worden waren, für die Zellkultur eingesetzt werden.

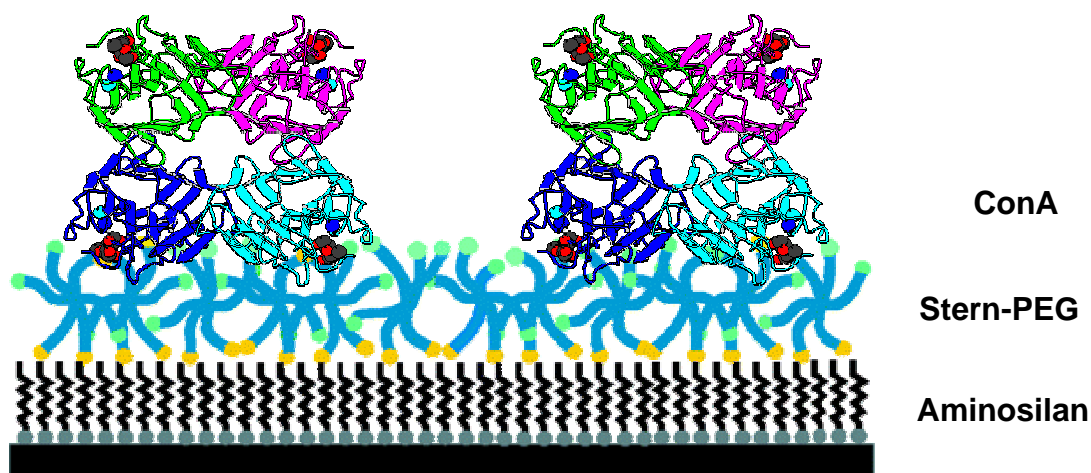


Abb. 17 Schematische Darstellung einer Stern-PEG Schicht mit aufgedruckten ConA - Molekülen.

Aminogruppen des ConA binden kovalent an die Isocyanatgruppen des sechsarmigen Stern-PEG Polymers. Das Stern-PEG ist seinerseits kovalent an eine Aminosilan-Monolage gebunden (modifiziert nach Groll, 2004).

Die Variation der Stempelzeit (zwischen 10 und 25 min) schien keinen Einfluss auf die Qualität des Proteintransfers bzw. auf die Netzbildung der Zellen zu haben.

Klassisches und inverses μ CP wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Wachstum der Neuriten zu kontrollieren miteinander verglichen. Dazu wurde FITC-gekoppeltes ConA verwendet, das entweder für 20 min klassisch gestempelt oder für drei Mal 20 min invers gestempelt wurde. Während klassisches μ CP im Fluoreszenzbild das gewollte

Muster ergab (Abb. 19), war bei der invers gestempelten Oberfläche die Fluoreszenz gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt (Abb. 18) und damit zur Musterherstellung ungeeignet.

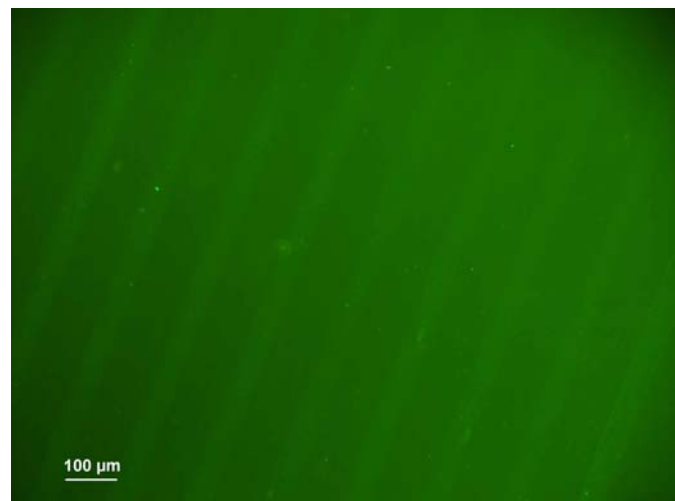


Abb. 18 FITC-gekoppeltes ConA auf Stern-PEG.

FITC - ConA wurde mittels inversem μ CP Stern-PEG Oberfläche aufgebracht. Es entstanden keine definierten FITC - ConA Streifen. Stattdessen war FITC – ConA relativ gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt. Die Anregungswellenlänge für FITC beträgt 488 nm).

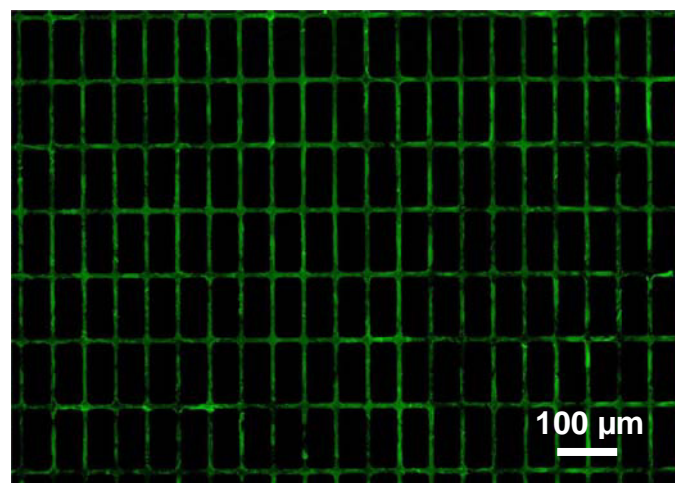


Abb. 19 Konfokaler Laser Scan einer Stern-PEG / FITC-ConA-Oberfläche.

Mittels μ CP wurde FITC-gekoppeltes ConA auf eine Stern-PEG Schicht aufgebracht. Die Gitterabstände betrugen 50 bzw. 100 μ m. Die Knoten waren 14 μ m stark und die Linien 6 μ m breit.

Es wurden verschiedene Vernetzungszeiten des Stern-PEG vor dem Stempeln, Stempelzeiten, Substrate und Stempelmuster getestet.

Die Benetzbarkeit des Stempels und / oder der Unterlage mit Wasser beeinflusste die Qualität des Stempelübertrags. Daher wurden die verwendeten Stempel mit SDS oder Ozon bzw. O₂-Plasma hydrophilisiert und die μ CP Ergebnisse mit solchen von unbehandelten Stempeln verglichen. Die mit hydrophilisierten Stempeln bedruckten Substrate wiesen gleichmäßig verteilte Proteinschichten auf. Bei den mit den unbehandelten Stempeln bedruckten Substraten hingegen war die Proteinschicht etwas dicker dafür aber weniger gleichmäßig (Abb.20).

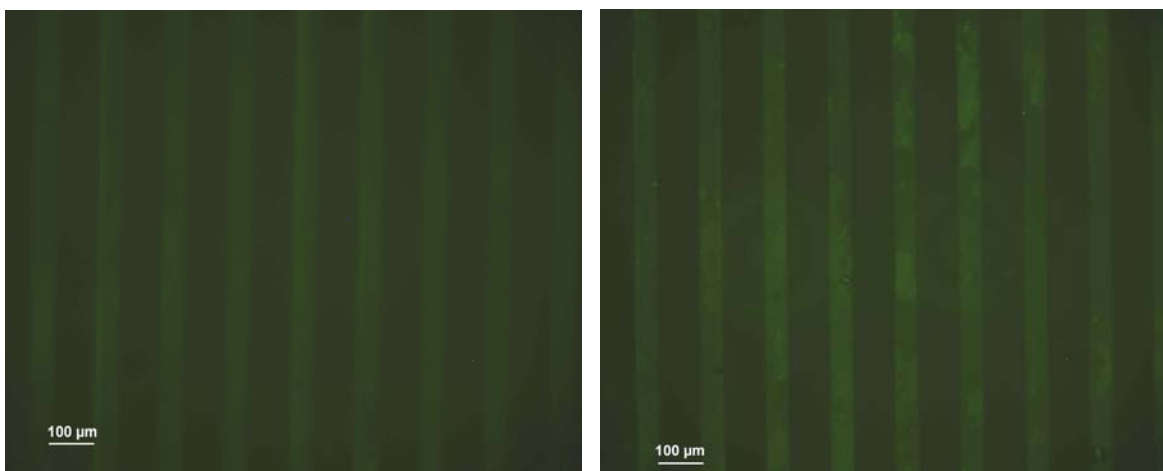


Abb. 20 μ CP mit SDS hydrophilisiertem (a) bzw. unbehandeltem Stempel (b).

a) Der Übertrag von ConA - FITC ist schwach aber gleichmäßig.

b) Der Übertrag ist stärker als in a), aber das ConA - FITC ist ungleichmäßig verteilt.

Die Belichtungsintensität und –Zeit war bei beiden Aufnahmen gleich.

Hinsichtlich der morphologischen Parameter der kultivierten Neurone waren keine Unterschiede festzustellen, weshalb auf eine Hydrophilisierung verzichtet wurde.

Es wurden einfache Linienmuster mit unterschiedlichen Dicken und variierenden Abständen hergestellt, um zu prüfen, welche Maße optimal für eine geometrische Kontrolle des neuronalen Wachstums sind. Ein dichtes Gittermuster (50 und 100 μ m Knotenabstände) mit ca. 50 – 70% der Somagröße starken Knoten und einer Liniendicke von 4 - 7 μ m erwies sich als optimal (siehe Abb. 21).

Die Zelldichte auf diesen Oberflächen war relativ hoch und der Abstand der Zellen zueinander klein genug, um die Wahrscheinlichkeit für einen morphologischen Kontakt zu erhöhen. Allerdings wuchsen die Neurone auch auf anderen Mustern sehr gut aus und hielten sich dabei vorwiegend an die vorgegebenen Grenzen. Nur wenige Neuriten hielten sich nicht explizit an den Proteinverlauf.

Um sicher zu stellen, dass die Musterbildung nicht auf einer Verdrängung der Stern-PEG-Schicht durch das Andrücken des Stempels beruht, wurde ein Stempel ohne Protein unter gleichen Versuchsbedingungen auf eine unvollständig auspolymerisierte PEG-Schicht platziert. Anschließend wurden Grillenneurone auf diesen Substraten ausplattiert. Als Kontrolle dienten mit ConA bestempelte Stern-PEG Oberflächen. Es gab kein Zellwachstum auf diesen Stern-PEG-Substraten, während auf den Kontrollen das Zellwachstum normal war. Das belegt, dass die Musterbildung offenbar nicht auf einer PEG-Verdrängung beruhte.

Darüber hinaus wurde in mehreren Experimenten die optimale Zelldichte für ein möglichst zahlreiches Überleben der Zellen bei gleichzeitig gutem Neuritenwachstum ermittelt. Dazu wurde die Zelldichte bei der Präparation variiert. Getestet wurde das Ausplattieren von allen Neuronen aus einem TG auf ein, zwei oder drei Coverslips. Neuronen aus einem TG auf zwei Coverslips ergaben eine gute Zelldichte und ein gutes Wachstum der Zellen (siehe z.B. Abb. 21 bis 23).

Beim Ausplattieren der Zellen auf den verkapselten Chips zeigte sich, dass der pH-Wert des Zellkulturmediums deutlich in den basischen Bereich verschoben wurde (von pH 7,0 nach pH > 8,0). Die ausplattierten Neurone adhärten zwar, wiesen aber ein reduziertes Neuritenwachstum auf. Auf den unverkapselten FETs wuchsen die Zellen wie gewohnt in Mustern aus.

Als Alternative zu PDMS als Stempelmateriale wurde Polyolefin, vor allem wegen der Langlebigkeit und Robustheit des Materials, ausprobiert. Diese Stempel wurden mittels *Hot Embossing* hergestellt. Ein vorher fluorosilanisierter SiO₂-Wafer wurde auf 180 °C erhitzt und ein ca. 1 x 1 cm großes Stück flacher Polyolefinfolie wurde mit definiertem Druck auf den Wafer gepresst. So wurde dessen Topographie auf das durch die Hitze formbar gewordene Polyolefin übertragen.

Die Zellen, die auf so hergestellten Mustern ausplattiert wurden, wiesen ein geringeres Neuritenwachstum auf. Auch die Überlebensrate war reduziert.

Es wurden PDMS Stempel auf fluorosilanisierten Wafern abgeformt, um zu testen, ob verbliebenes Fluorosilan auf dem Wafer an den Polyolefinstempeln die Ursache für die schlechte Verträglichkeit des Substrates war. Mit diesen Stempeln bedruckte Substrate wurden für die Zellkultur eingesetzt. Bei diesen Zellkulturen gab es keine Unterschiede Fluorosilan-freien Substraten.

Standardparameter zur Kopplung von ConA an Stern-PEG

Nachdem verschiedene Experimente zur Kopplung von ConA an Stern-PEG durchgeführt worden waren, wurden die Standardparameter wie folgt festgelegt: Zunächst wurden wie in Abschnitt 3.2.1.3. unter „Herstellung von Stern-PEG Oberflächen“ beschrieben, mittels Spin Coating Stern-PEG-Schichten auf aminosilanisierte Glascoverslips aufgebracht. Nach 2 h Vernetzungszeit wurde mit unbehandelten PDMS-Stempeln ein ConA - Proteingitter aufgedruckt (klassisches μ CP). Die Stempel wurden 10 min in der ConA - Lösung inkubiert, im N_2 -Strom getrocknet und 20 min lang auf der noch weichen Stern-PEG Schicht stehen gelassen. Der Stempel wurde vorsichtig entfernt und die Substrate wurden über Nacht zur weiteren Vernetzung des Stern-PEGs im Kühlschrank stehen lassen. Am nächsten Tag wurden die beschichteten Glascoverslips drei Mal mit sterilem Aqua bidest. gewaschen und für die Zellkultur von Grillenneuronen eingesetzt. Es wurden Neuronen aus einem TG auf zwei Coverslips ausplattiert.

3.2.2. Morphologie der Zellen

Die Stern-PEG / ConA-Oberflächen wurden hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und der Fähigkeit, Musterbildung zu induzieren, getestet. Dazu wurden Grillenneurone auf die Oberflächen ausplattiert und nach 7-10 Tagen im Mikroskop betrachtet. Es zeigte sich, dass die Zellen und ihre Ausläufer strikt den vorgegebenen Gitterstrukturen folgten. (Abb. 21 bis 24).

3.2.2.1. Lichtmikroskopie

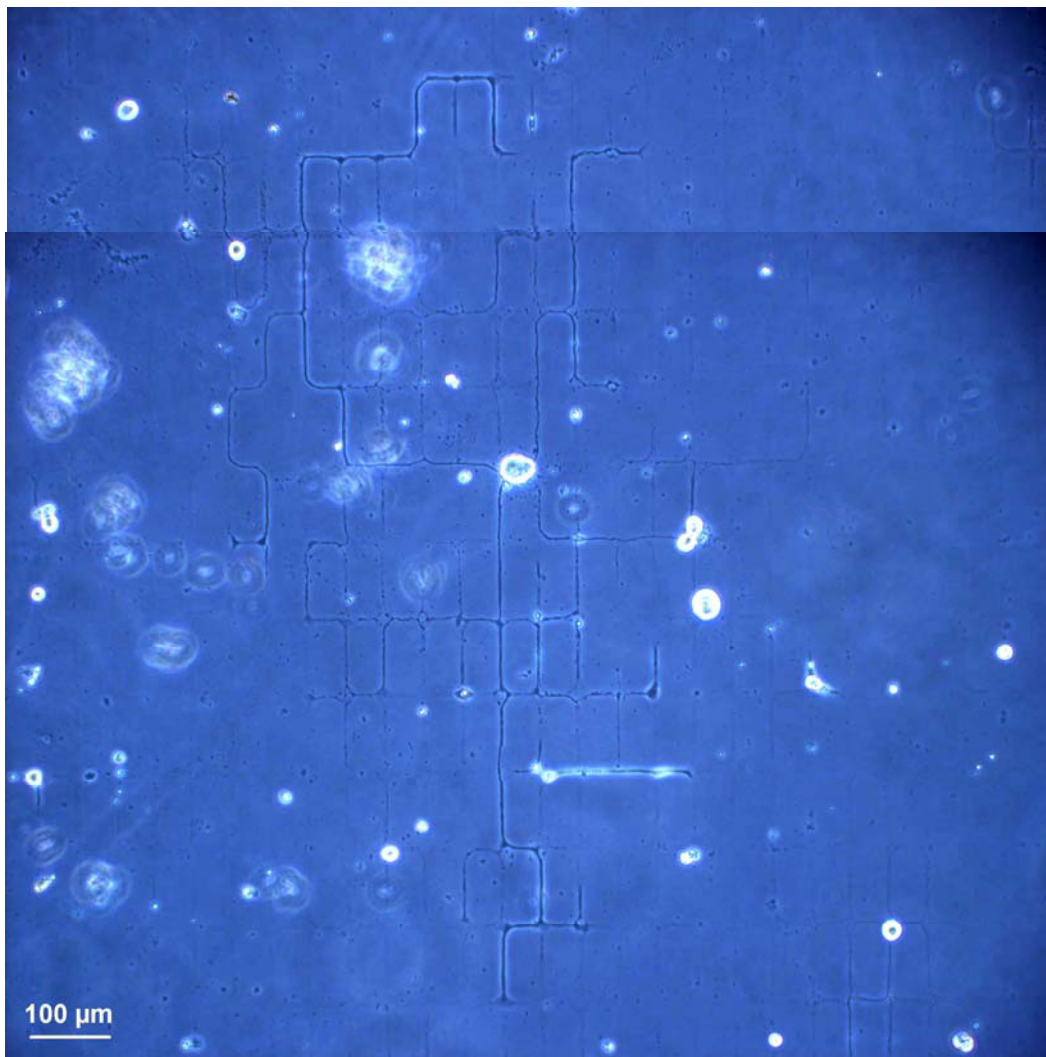


Abb. 21 Phasenkontrastmikroskopie von Grillenneuronen (DIV 7), die auf einer Stern-PEG / ConA Oberfläche ausplattiert wurden.

Die Neuriten der auswachsenden Zelle folgten den aufgestempelten ConA - Mustern und wurden mehrere Hundert µm lang. Die Gitterabstände betrugen 50 bzw. 100 µm. Die Knoten waren 22 µm stark und die Linien 4 µm breit.

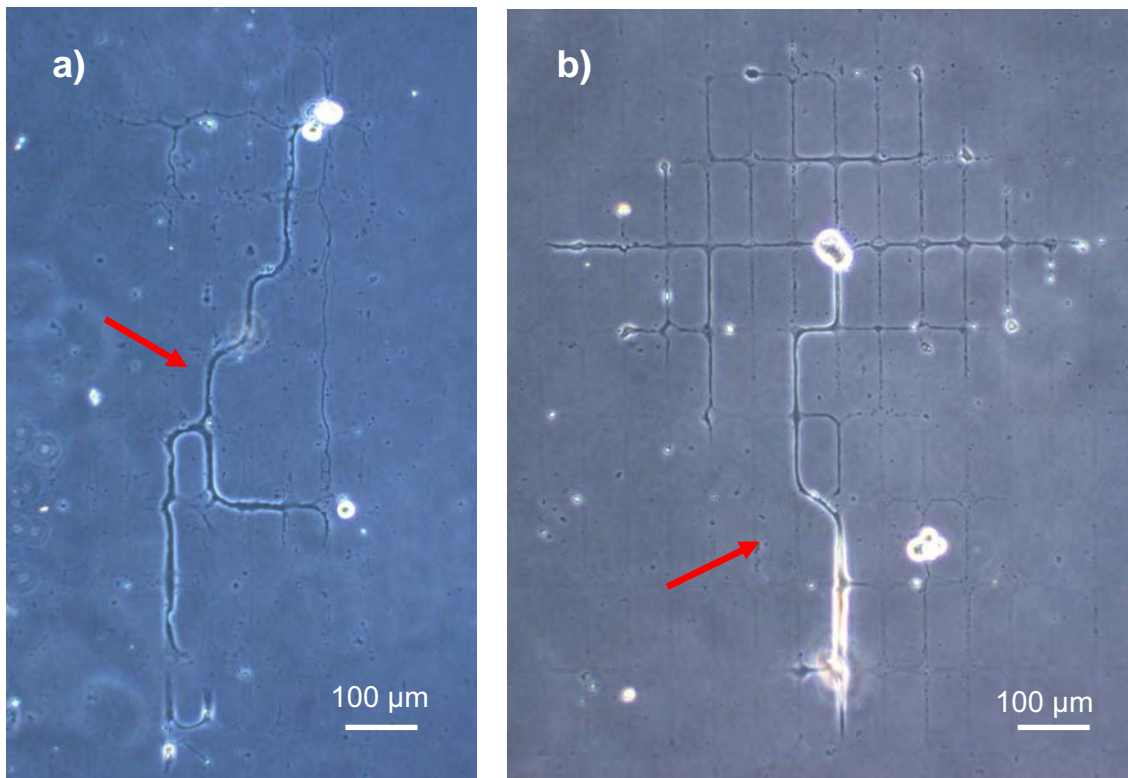


Abb. 22 Grilleneurone auf Gittermustern aus ConA auf Stern-PEG an DIV 7(A) und DIV 10 (B).

Die Neuritenbäume erstreckten sich wiederum über mehrere Hundert µm. Die Zellen, die in Abbildung 22 a) und b) zu sehen sind, wiesen jeweils einen besonders langen und breiten Neuriten auf (mit roten Pfeilen markiert). Es könnte sich dabei um die Axone der Zellen handeln.

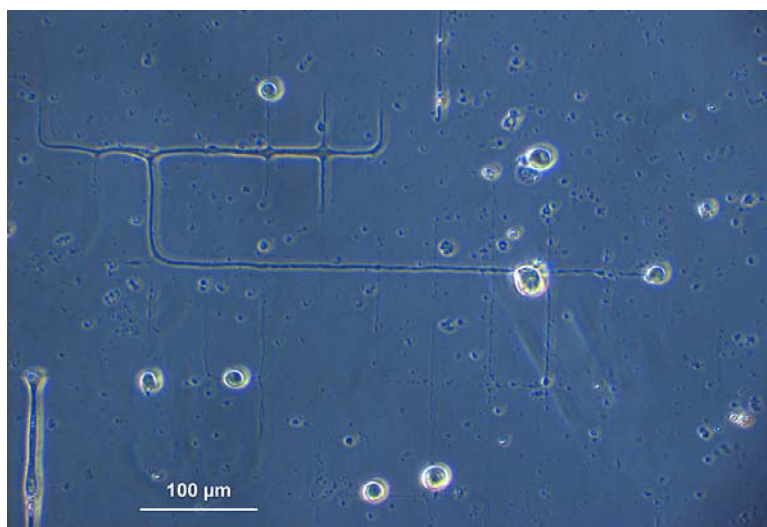


Abb. 23 Netzwerk aus Grillenneuronen (DIV 6).

Grillenneurone, die ein morphologisches Netzwerk auf einem ConA / Stern-PEG bilden.

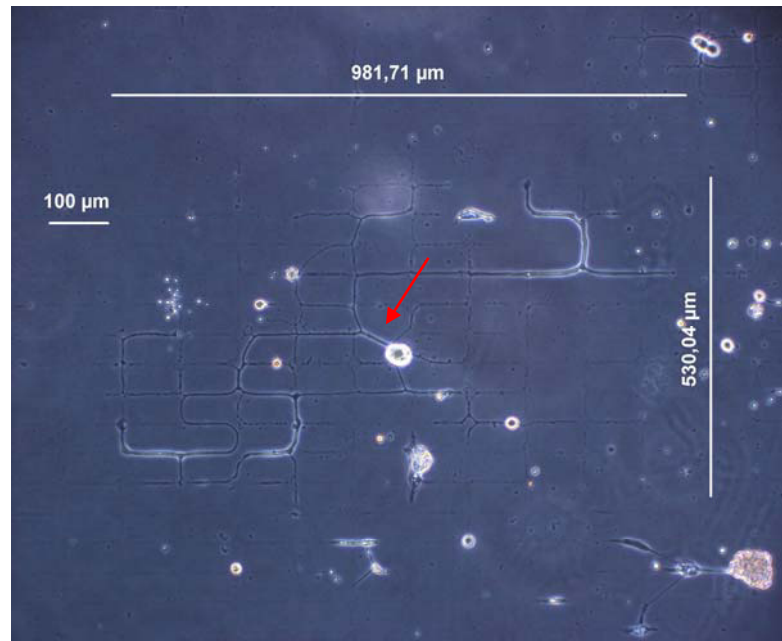


Abb. 24 Gittermuster aus ConA auf Stern-PEG aufgebracht mittels μ CP (DIV 9).

Diese Zelle bildete einen weit verzweigten Neuritenbaum auf einer Fläche von annähernd $0,5 \text{ mm}^2$. Der markierte Neurit überspannt ein Stück der Stern-PEG Oberfläche.

Als Alternative zu ConA wurde versucht, andere Proteine wie z.B. Poly-L-Lysin und Laminin auf Stern-PEG zu stempeln und Musterbildung zu induzieren. Der Stempelübertrag beider Proteine war schlecht. Auch die Adhärenz und das Neuritenwachstum der Zellen waren nicht zufrieden stellend.

Zusätzlich wurden Cortezellen auf die ConA - Stern-PEG Gittersubstrate ausplattiert. Sie zeigten eine geringere Mustertreue als auf den für sie optimierten Substraten, richten sich aber auch an den gegebenen Strukturen aus. Außerdem waren die Neuriten kräftiger und breiter als auf Standardsubstraten.



Abb. 25 Cortexzellen auf einem ConA Gitter auf Stern-PEG (DIV 3).

Die Ausläufer der Cortexzellen richten ihr Wachstum weitgehend an das Gittermuster aus. An einigen Stellen überschreiten die Neuriten das Gitter (rote Kreise).

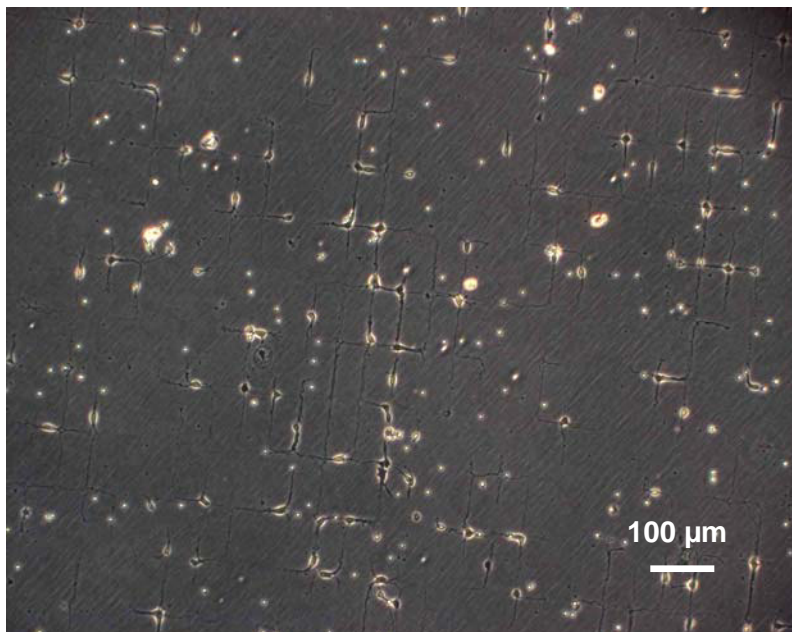


Abb. 26 Cortexzellen auf einem P-ECM Gitter auf Polystyrol (DIV 3).

Mittels μ CP wurde P-ECM auf Polystyrol in Gittermustern aufgebracht. Auf diese wurden Rattencortexzellen kultiviert. Das Polystyrol wirkt aversiv auf Cortexneurone und die Zellen wachsen nur auf dem vorgegebenen P-ECM Gitter. P-ECM ist eine Mischung aus Poly-L-Lysin und Extrazellulärmatrix-Proteinen. Quelle: Decker T.

3.2.2.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Untersuchung der Zellen im REM (siehe Abschnitt 2.5.) ermöglichte eine Beurteilung des Zustandes der Zelloberfläche im Submikrometerbereich. Zum anderen konnte die Topographie der Proteingrenzen analysiert und die Mustertreue der Zellausläufer betrachtet werden. Die Zellen, die auf den verschiedenen ConA / Stern-PEG Substraten gewachsen waren, wurden, wie in Abschnitt 2.5. beschrieben, für die REM-Messungen fixiert, dehydriert, kritisch-Punkt getrocknet und besputtert. Abb. 27 zeigt eine Aufsicht (60°) auf den Übergang zwischen ConA und Stern-PEG an einem Knotenpunkt eines aufgestempelten Gittermusters. Die Stern-PEG Oberfläche erscheint im REM-Bild völlig glatt, während der Bereich, auf dem das Protein aufgebracht wurde, deutlich rauer aussieht. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Protein dem Stern-PEG aufgelagert ist.

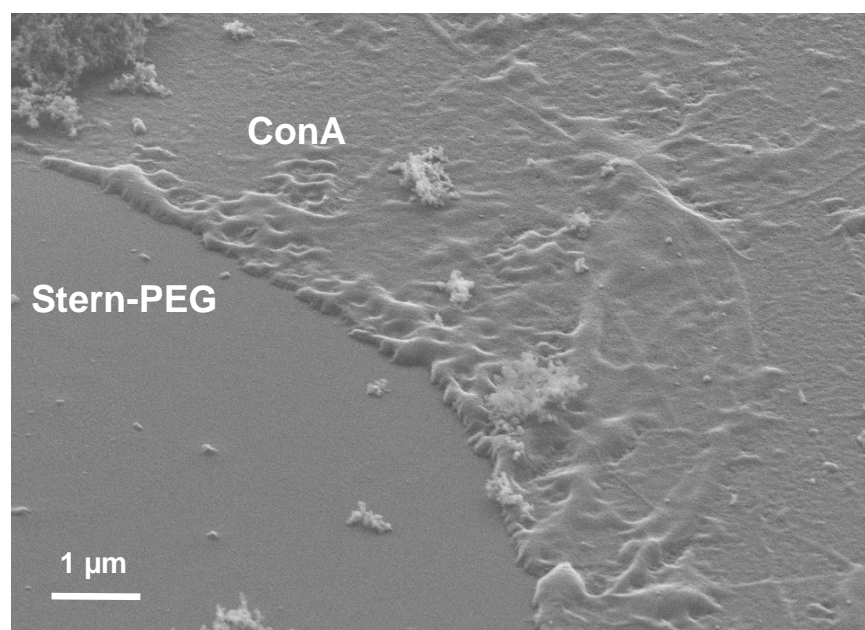


Abb. 27 Übergang zwischen ConA und Stern-PEG Unterlage an einem Knoten des ConA-Gittermusters.

Ein deutlicher Kontrast in der Sekundärelektronenemission ist am Übergang zwischen Protein und Stern-PEG sichtbar. Die Oberfläche des Proteins erschien sehr uneben, während das Stern-PEG eine glatte Oberfläche bildet.

Die Zellen, die auf diesen ConA / Stern-PEG Oberflächen gewachsen waren, zeigten eine deutliche Präferenz für ConA (Abb. 21). Außerdem war zu sehen, dass die Zellkörper nicht nur auf den Knotenbereichen, sondern auch auf den Linienverbindungen zwischen den Knoten adhärten. Während die Neuriten einen guten Kontakt zur Oberfläche ausbildeten (Abb. 26), hatten einige Zellkörper weniger guten Kontakt (Abb. 24). Zellkörper, die auf den Linien adhärten, hatten nur eine kleine Kontaktfläche. Die Zellen wurden nach nur 2 Tagen in Zellkultur für die REM-Untersuchung präpariert. Daher sind die Neuriten noch relativ kurz.

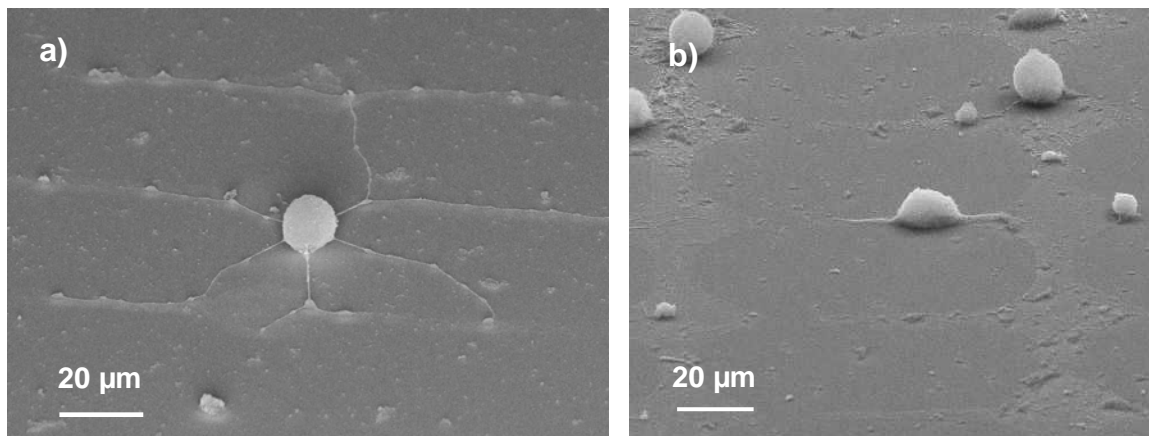


Abb. 28 Grillenneurone auf einem ConA - Gittermuster auf Stern-PEG.

Die auf einem ConA / Stern-PEG Gitter ausgesäten Zellen zeigten eine deutliche Präferenz für die Bereiche mit ConA - Beschichtung. a) DIV 7 b) DIV 2.

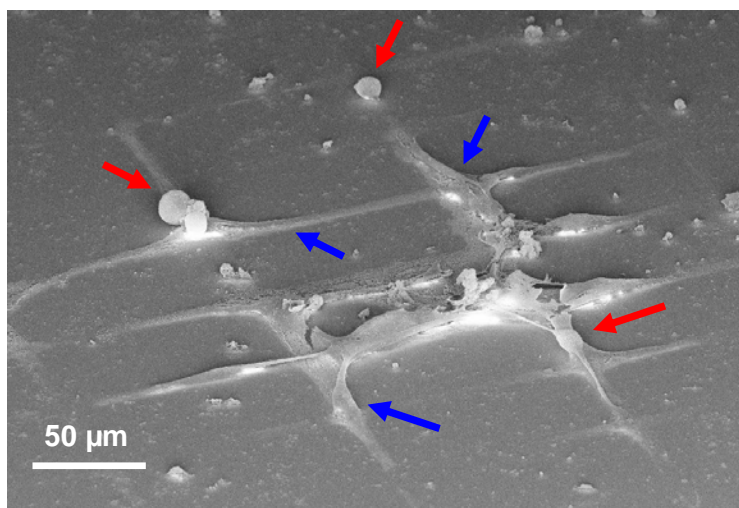


Abb. 29 Grillenneurone auf ConA / Stern-PEG Gittermuster (DIV 7).

Grillenneurone (rote Pfeile) wuchsen auf einem Geflecht aus Gliazellen (blaue Pfeile), die ihr Wachstum am ConA / Stern-PEG Gitter ausrichteten.

3.2.2.3. AFM

Wie in Abschnitt 3.2.1. bereits gezeigt, schien sich das Neuritenwachstum an der ConA - Konzentration zu orientieren. Das wurde vor allem beim Wachstum auf 50 oder 100 μm breiten Linien beobachtet (Abb. 11). Die Neuriten der Grillenneurone waren überwiegend an den Rändern der aufgestempelten ConA - Streifen zu finden. Diese Beobachtung wurde sowohl auf Glas als auch auf Stern-PEG gemacht.

Mit Hilfe von AFM-Messungen wurde die genaue Topographie der aufgestempelten ConA - Muster auf Stern-PEG untersucht. Zu diesem Zweck wurden, wie in Abschnitt 3.2.1.4. beschrieben, 1 μm breite ConA - Streifen mit einem Abstand von 1 μm mittels μCP auf eine Stern-PEG Oberfläche aufgebracht. Diese Oberfläche wurde dann mit AFM vermessen. Das Protein schien sich am Rand der Stempelaussparung anzuhäufen.

Abb. 30 zeigt eine AFM-Messung und Abb. 31 und 32 die dazugehörigen Höhenbestimmungen.

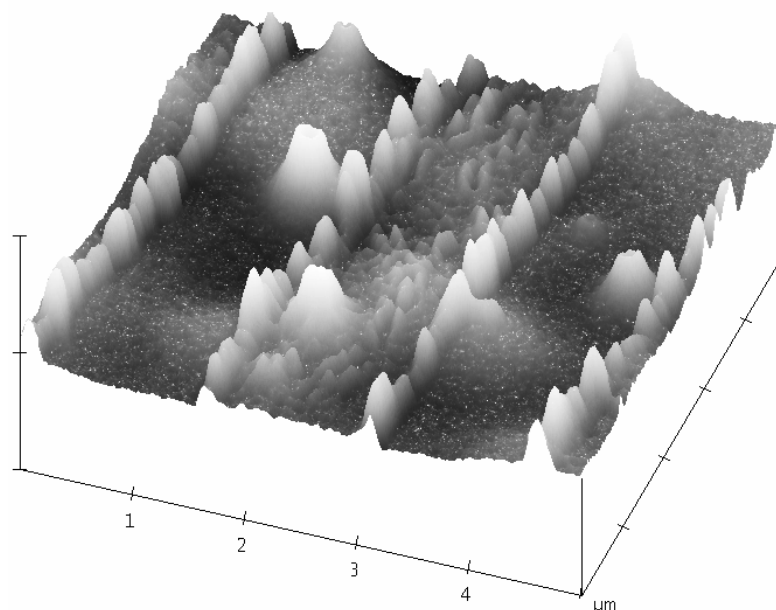


Abb. 30 AFM Analyse eines 1 μm breiten ConA - Streifens mittels μCP auf Stern-PEG aufgebracht, gemessen mit dem AFM.

An den Rändern des PDMS Stempelabdrucks ist die ConA Höhe größer als in der Mitte des Streifens.

Die Höhenunterschiede des ConA innerhalb eines Streifens und der Umgebung betrugen nur ca. 10 nm. (Abb. 31 a) Die Ränder des ConA - Streifens zeigten eine deutliche Erhebung, welche in Abb.31 b) vermessen wurde. Ihre Höhe betrug in dieser Messung 106 nm bei einer Breite von 312 nm.

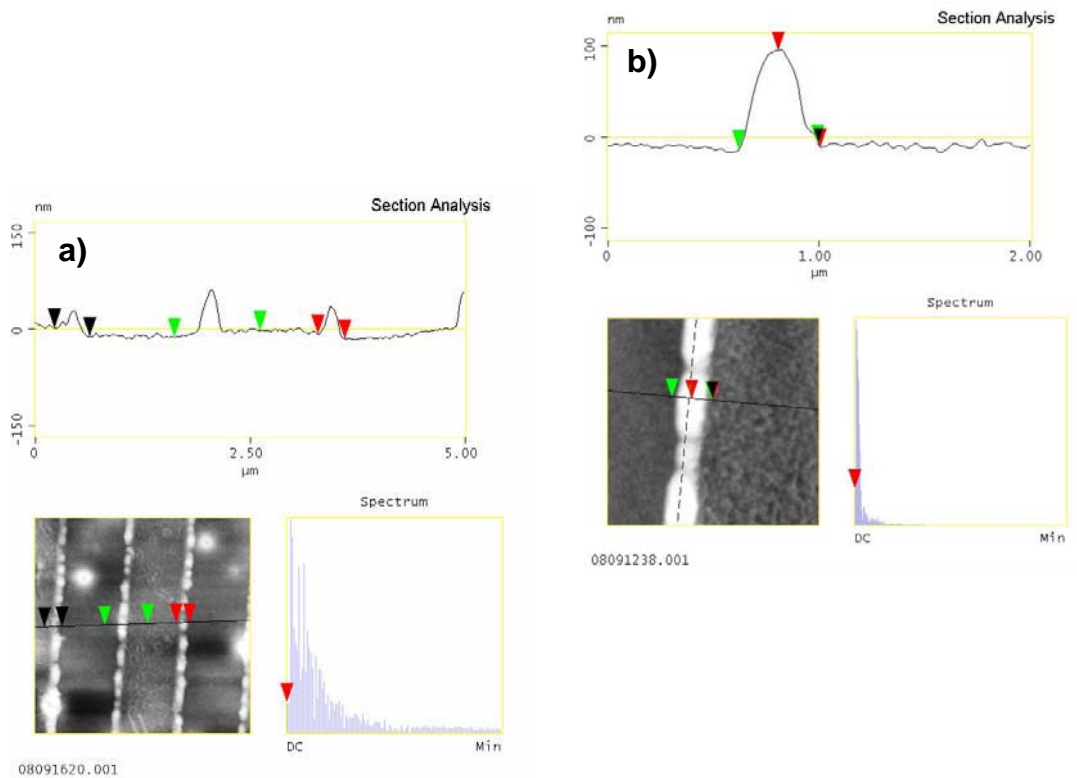


Abb. 31 Analyse des Höhenprofils von ConA - Streifen auf Stern-PEG.

Jeweils zwei Pfeile einer Farbe stellen die Messpunkte, deren Differenz bestimmt wurde dar (abzulesen im Datenkasten rechts).

a) Der Höhenunterschied zwischen dem ConA und Stern-PEG beträgt ca. 10 nm.

b) Der Rand des ConA - Streifens hat eine Breite von 375 nm und eine Höhe von ca. 100 nm.

3.3. Elektrophysiologie

Die mikroskopischen Untersuchungen hatten gezeigt, dass die kultivierten Grillenneurone sowohl auf homogenen als auch auf strukturierten Substraten Neuriten regenerierten und insgesamt morphologisch einwandfrei erschienen. Nachfolgend wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen mit Hilfe von Patch-Clamp Experimenten untersucht. Dazu wurden Ableitungen im whole-cell Modus unter Current-Clamp und Voltage-Clamp Bedingungen durchgeführt.

Die elektrophysiologischen Daten der Einzelneurone auf ConA / Stern-PEG und auf homogener ConA – Oberfläche wurden zusammengefasst, da hinsichtlich der elektrophysiologischen Eigenschaften keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Im VC-Modus wurden die Zellen jeweils auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt und dann in 10 mV Schritten bis auf 30 mV geklemmt. Im Current-Clamp Modus wurden die Zellen auf denjenigen Stromwert geklemmt, bei dem das Membranpotential -70 mV ergab und anschließend wurden Ströme von -0,2 bis 1 nA in 0,1 nA Schritten appliziert. Entsprechend ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften wurden die Zellen in drei Subtypen unterteilt: non spiker, single spiker, burster. Von 51 untersuchten Zellen waren 12 nicht in der Lage APs zu generieren (siehe Abb. 32). Sie werden im Folgenden als non spiker bezeichnet. Im VC-Modus zeigten sie keine einwärts gerichteten Ströme. Das mittlere Membranpotential V_m lag bei $-45,2 \pm 10,8$ mV. Bei den 20 identifizierten single spikern lag das mittlere V_m bei $-42,8 \pm 6,0$ mV. Sie zeichneten sich dadurch aus, dass sie auch bei maximaler Stromapplikation (1 nA) nicht mehr als ein AP generierten. Im VC-Modus sieht man beim single spiker deutlich einen schnelleren einwärts gerichteten Strom am Anfang der Spur. Die burster waren fast genauso häufig vertreten wie single spiker. Das mittlere V_m der 19 gefundenen burster lag im Durchschnitt bei $-49,5 \pm 8,1$ mV. Dieser Zelltyp zeigt eine schnelle Abfolge von APs im CC-Modus. Im VC-Modus war entsprechend eine Serie von Einwärtsströmen zu sehen.

Das mittlere Membranpotential aller Zelltypen lag bei $-45,3 \pm 7,8$ mV.

Das prozentuale Zahlenverhältnis der 3 Subtypen lag bei ca.: 24% aller untersuchten Neurone waren non spiker, 39% single spiker und 37 % waren burster.

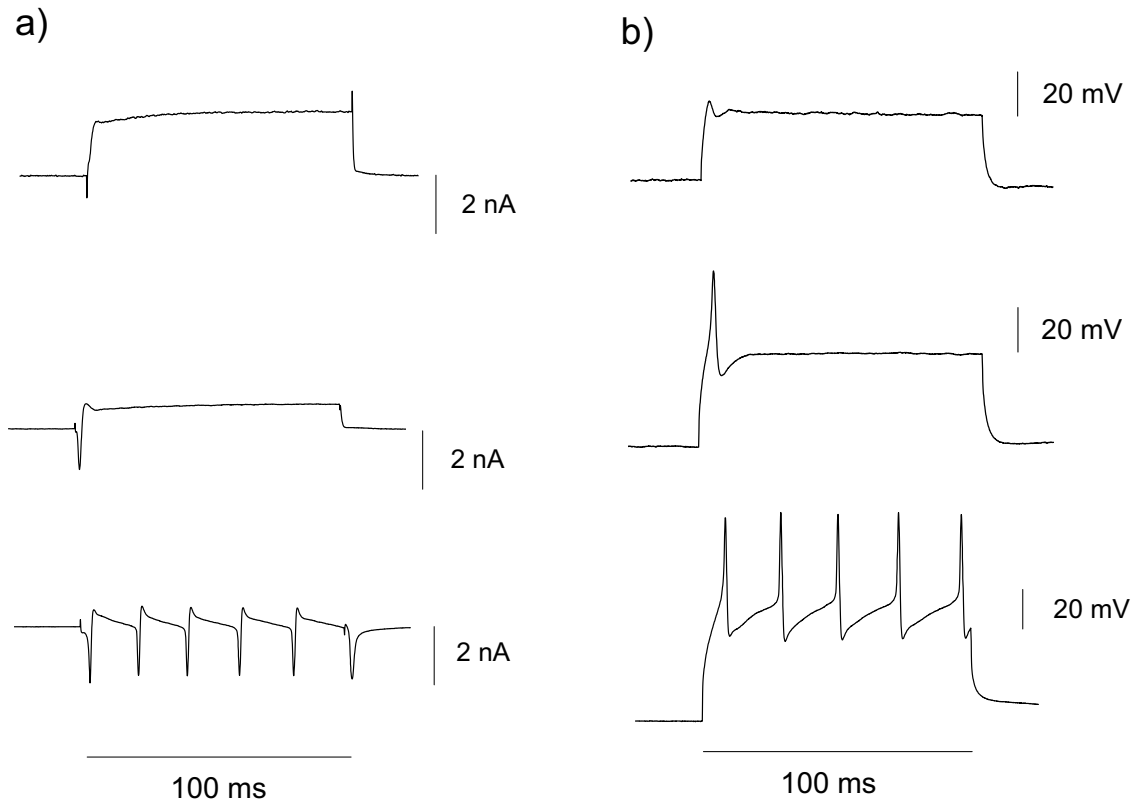


Abb. 32 Elektrophysiologische Messungen zur Unterscheidung der drei Zelltypen.

a) Voltage-Clamp Ableitungen der drei Zelltypen: non spiker, single spiker und burster.

Alle Zellen sind von -70 mV auf -10 mV depolarisiert worden. Während der non spiker kaum Einwärtsströme aufwies, flossen beim single spiker zu Beginn des Depolarisationspulses Kationen in die Zelle, beim burster geschah dies in einer Serie mehrmals hintereinander.

b) Current-Clamp Ableitungen der drei Zelltypen .

Diese Spuren sind bei einem Reizstrom von 0,7 nA gemessen worden. Die geringen Einwärtsströme im non spiker führten zu einem geringen Anstieg des Potentials, erreichen aber nicht die Schwelle für ein AP, wohingegen beim single spiker zu ein AP auslösten. Der burster generierte eine Reihe von APs.

Im VC-Modus wurden von jedem Zelltypen mittlere I/V-Kennlinien sowohl der Einwärtsströme als auch Auswärtsströme erstellt. Das Haltepotential wurde in einem Bereich von -100 mV bis +30 mV in 10 mV Schritten variiert.

Ab einem Haltepotential von etwa -40 mV zeigten alle Zelltypen auswärts gerichtete Ströme (Abb. 33). Die Stromamplituden der single spiker und der burster waren ab diesem Haltepotential hoch signifikant unterschiedlich von den Amplituden der non spiker ($p < 0,01$, Student's test). Die Stromamplituden aller Zelltypen waren linear vom Haltepotential abhängig, wobei die single spiker die größten Auswärtsströme erzeugten (3,5 nA bei 30 mV), gefolgt von den burstern (2,4 nA bei 30 mV). Non spiker wiesen die kleinsten Amplituden auf (1,8 nA bei 30 mV).

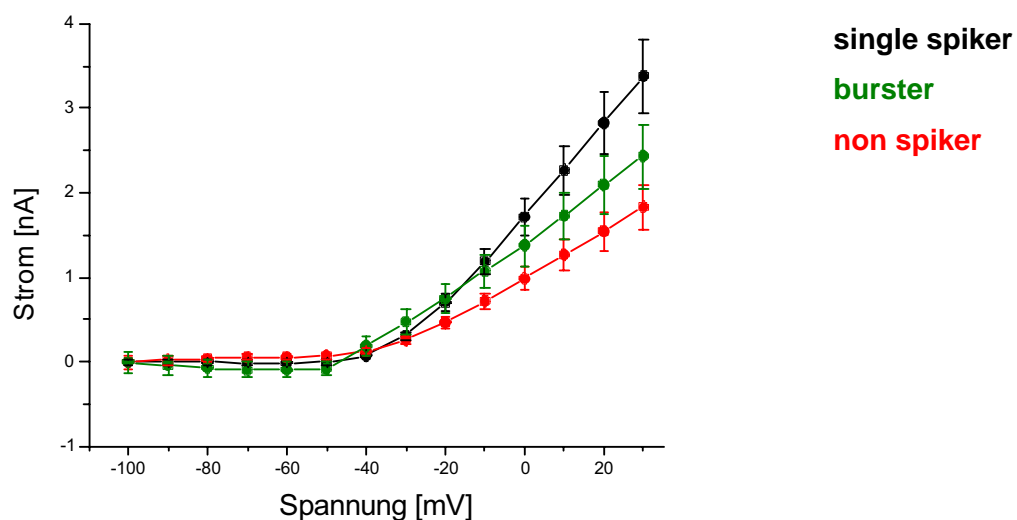


Abb. 33 I/V - Kennlinie: Vergleich der auswärts gerichteten Ströme der drei Zellsubtypen.

Jeder Punkt gibt die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 12, 20 oder 19 (non spiker, single spiker, burster) Messpunkten wieder.

Die I/V – Kennlinie der einwärts gerichteten Ströme ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen non spikern und single spikern.

Beide Zelltypen generierten, wenn überhaupt, einwärts gerichtete Ströme von maximal -0,5 nA Amplitude. Die I/V – Kennlinie für burster zeigt einwärts gerichtete Ströme, die ab einem Haltepotential von -50 mV einsetzen und ihre maximale Amplitude von etwa -1,7 nA bei 30 mV erreichen. Im Gegensatz zum linearen Kurvenverlauf der auswärtsgerichteten Ströme, ist für die einwärts gerichteten Ströme der burster eine Sättigung (bei etwa -1,5 nA) zu erkennen. Die Stromamplituden sind ab einem Haltepotential von -40 mV signifikant ($P = 0,05$) bzw. ab -30 mV hoch signifikant ($P < 0,01$) unterschiedlich zu den non spikern.

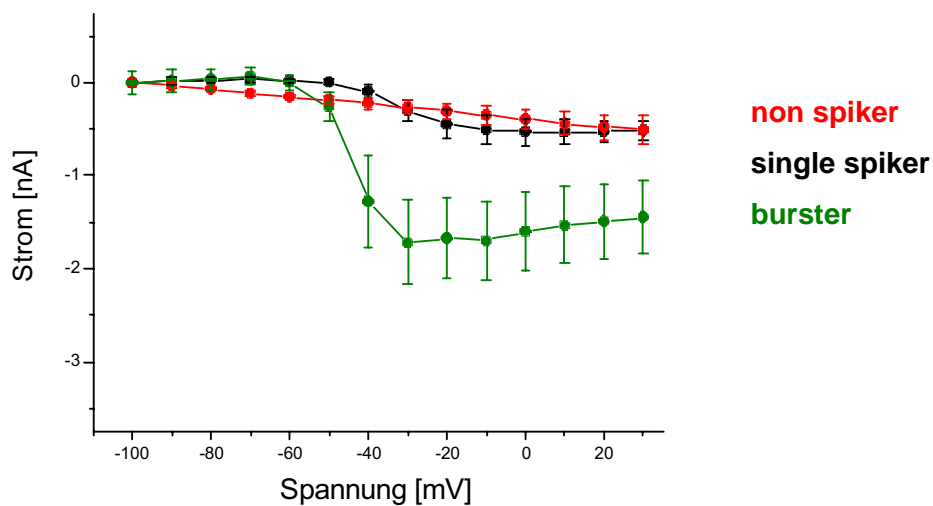


Abb. 34 I/V - Kennlinie: Vergleich der einwärts gerichteten Ströme der drei Zelltypen.

Die Einwärtsströme unterscheiden sich signifikant. Bei den burstern sind die einwärts gerichteten Ströme am größten. Bei den beiden anderen Typen sind sie etwa gleich groß.

Synapsen

Mit Hilfe dieser Experimente wurde überprüft, ob es sich bei der morphologischen Verknüpfung um eine funktionelle Synapse handelt.

Wenn zwei Zellen sich in unmittelbarer Nähe zueinander befanden und ihre Ausläufer morphologisch zu verbunden sein schienen, wurden so genannte Double Patch-Clamp Experimente durchgeführt. Beide Zellen wurden gleichzeitig mit Patch-Clamp Pipetten kontaktiert und abgeleitet, aber nur eine der Zellen wurde stimuliert. Abb. 35 zeigt zwei verknüpfte Zellen während der Messung. Die Zellsomata befanden sich ca. 150 μm voneinander entfernt. Die mutmaßliche Kontaktzone ist mit einem Kreis rot markiert. Die Zellen befanden sich 5 Tage in Zellkultur.

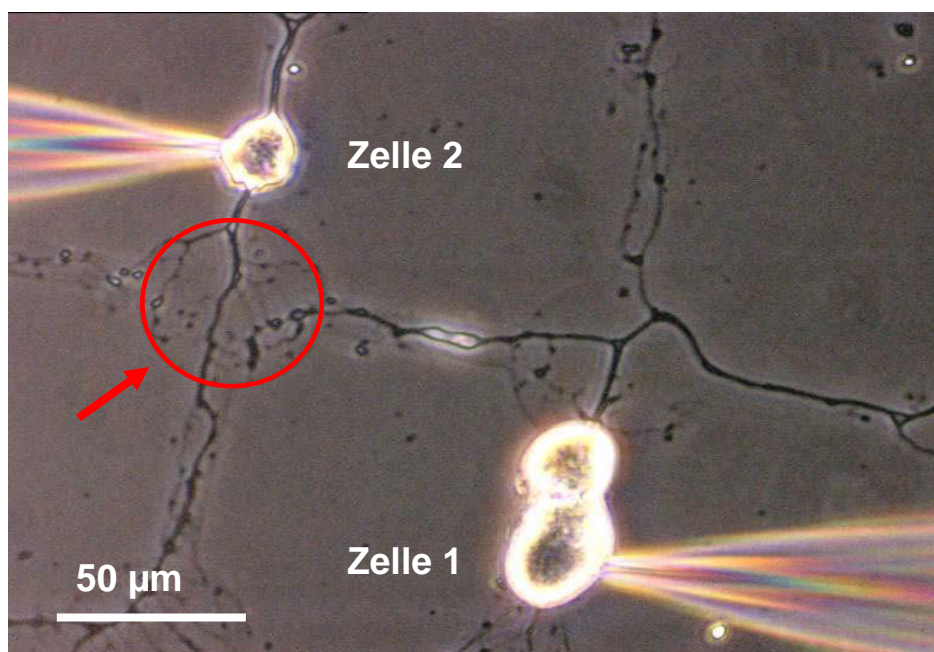


Abb. 35 Zwei durch eine chemische Synapse verbundene Zellen auf einem ConA Gittermuster auf Stern-PEG.

Morphologisch verbundenes Netzwerk zweier Grillenneurone (DIV 5) während einer Double Patch-Clamp-Ableitung.

Die Abb. 36 bis Abb. 38 zeigen die Ableitungen der beiden Zellen aus Abb. 35. Sie repräsentieren eine von zwei chemischen Synapsen, die in den Zellkulturen mit induziertem Musterwachstum untersucht werden konnten. Zelle 1 hatte ein Membranruhepotential von -48 mV und Zelle 2 -40 mV. Zelle 1 gehörte zur Gruppe der burster und Zelle 2 war ein non spiker (vergleiche Abb. 34). Abb. 36 zeigt, dass die Stimulation von Zelle 1 mit einem Strom von 0,4 nA für 100 ms zu einer Serie von Aktionspotentialen in dieser Zelle führte. Zelle 2 zeigte nach jedem AP von Zelle 1

jeweils ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) (Abb. 36). Die Latenzzeit zwischen präsynaptischem AP und EPSP wurde zu 1,1 ms bestimmt. Dazu wurde die Zeitverzögerung zwischen der maximalen Spannungsamplitude in Zelle 1 und dem beginnendem Spannungsanstieg in Zelle 2 bestimmt (Abb. 37).

Abb. 38 zeigt eine Voltage-Clamp Ableitung der gleichen chemischen Synapse. Als Stimulus wurde das Potential für 100 ms von -70 mV auf 0 mV verschoben und die resultierenden Ströme aufgezeichnet. Auch in dieser Ableitung sieht man eine Korrelation zwischen den einwärts gerichteten Strömen in beiden Zellen. Die Latenzzeit betrug 1,6 ms.

Die Amplitude des einwärts gerichteten Stromes in Zelle 1 betrug 1,1 nA und der resultierende exzitatorische postsynaptische Strom (EPSC) in Zelle 2 lag bei 0,25 nA.

Um zu untersuchen, ob die Signalübertragung zwischen beiden Zellen umkehrbar ist, wurde (statt Zelle 1) Zelle 2 stimuliert und beide Zellsignale aufgezeichnet. Zelle 1 reagierte weder unter CC-Bedingungen noch unter VC-Bedingungen auf die Stimulation von Zelle 2.

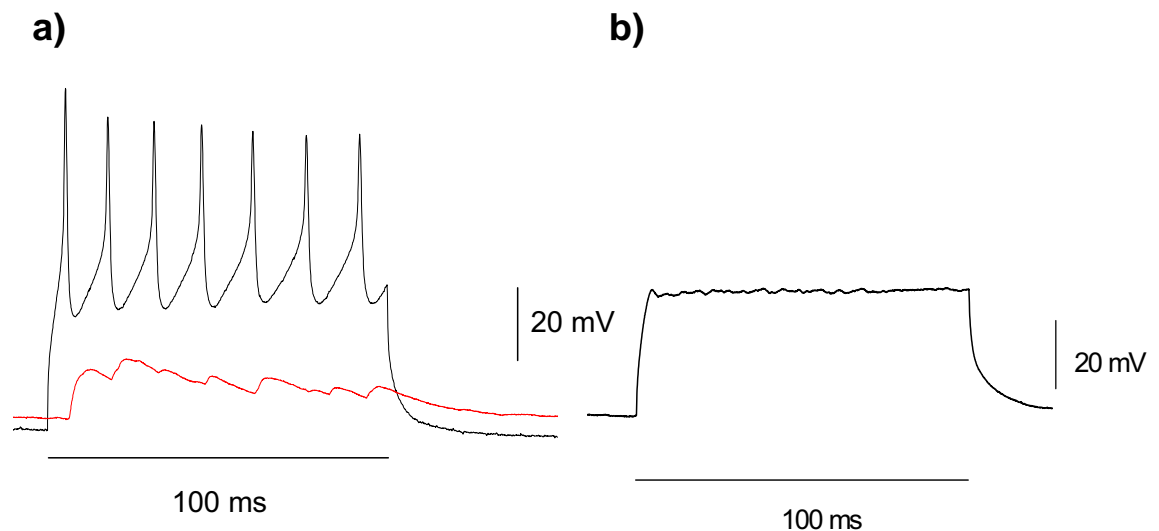


Abb. 36 Double Patch-Clamp Ableitung der in Abb. 35 gezeigten Neurone im CC-Modus.

a) Für 100 ms wurde ein Reizstrom von 0,4 nA appliziert. Die präsynaptische Zelle reagierte mit einer Serie von APs (schwarze Spur), die ihrerseits zu EPSPs in der simultan abgeleiteten Postsynapse führte (rote Spur).

b) Current-Clamp Spur von Zelle 2. Die Current-Clamp Ableitung von Zelle 2 zeigt, dass sie zum Subtypen der nicht spikenden Zellen gehört. Bei einer Applizierung von 0,4 nA für 100 ms generierte die Zelle keine APs.

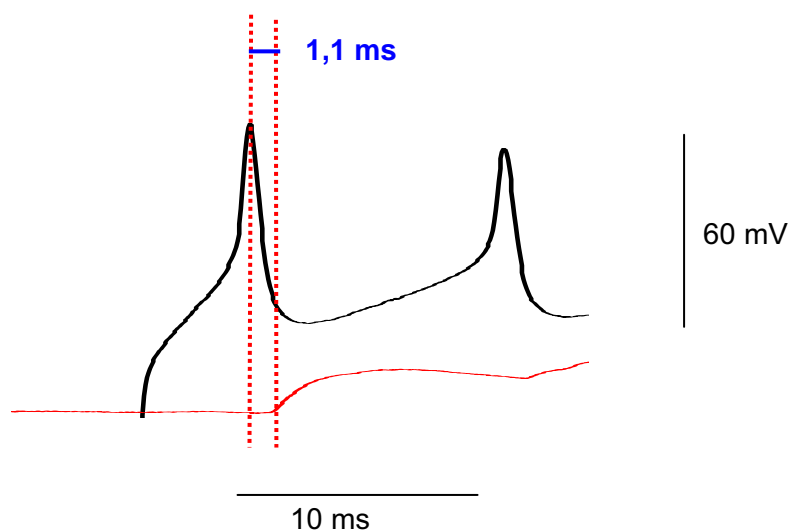


Abb. 37 Bestimmung der Latenzzeit.

Als Latenzzeit wurde die Zeit zwischen maximaler Amplitude des präsynaptischen APs und Beginn des EPSPs definiert (rote unterbrochene Linien).

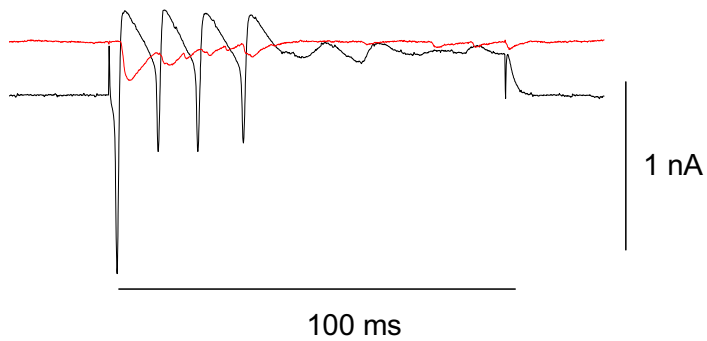


Abb. 38 Double Patch-Clamp Ableitung der in Abb. 35 gezeigten Neurone im VC-Modus.

Für 100 ms wurde das Klemmpotential von -70 mV auf 0 mV geändert. Die präsynaptische Zelle reagierte mit einer Serie von Einwärtsströmen (-1,1 nA, schwarze Spur), die ihrerseits in der simultan abgeleiteten Postsynapse zu einem Einwärtsstrom (-0,25 nA, rote Spur).

4. Diskussion

4.1. Qualität der Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bereits etabliertes Zellkulturprotokoll zur Kultivierung von Grillenneuronen des Terminalganglion verwendet (Kloppenburg und Hörner, 1998; Schulte P. et al., 2005). Es wurde auf den Zusatz von wachstumsfördernden Agenzien, Hirn- und Hämolymphextrakten, Proteinen und Serum verzichtet, weil diese Zusätze unbekannte Faktoren für die Zelldifferenzierung und die Elektrophysiologie darstellen. Beispielsweise fördert der Nerve Growth Factor (NGF) nicht nur das Auswachsen von neuronalen Fortsätzen und das Überleben von Neuronen bei Vertebraten und Invertebraten (Ridgway et al., 1991), sondern er erhöht auch spannungsaktivierte Calciumströme (McDowell, 2004; Wildering et al., 1995) und verändert so die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen. Serumproteine, wie sie in fötalem Kälberserum vorhanden sind, werden zur Kultivierung von Neuronen verschiedener Insektenspezies verwendet (Pfahlert und LakesHarlan, 1997; Harrison et al., 1990; Hayashi und Hildebrandt, 1990), behindern in der Grillenzellkultur aber die Anheftung der Zellen (Cepok, 1999; pers. Komm. Schulte P.). Da das bereits etablierte Zellkulturprotokoll ein gutes Auswachsen und Überleben der Zellen (bis zu 21 Tagen) ermöglichte, wurde auf eine Veränderung des Zellkulturprotokolls bzw. weiterer Zusätze verzichtet. Die frisch dissoziierten Zellen adhärten innerhalb von 60 min an den ConA beschichteten Oberflächen und begannen innerhalb weniger Stunden mit der Ausbildung von Neuriten, deren Anzahl und Länge im Verlaufe der Zellkultur zunahm. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um einen Regenerationsprozess, da ausschließlich adulte, vollständig ausdifferenzierte Neurone für die Zellkultur präpariert wurden.

Die Zahl und Form der wieder ausgewachsenen Neuriten variierte erheblich. Es wurden neben unipolaren auch bi- und multipolare Neurone gefunden (Abb. 6). Je nach Lage zu benachbarten Zellen bildeten sich spontan morphologisch miteinander verknüpfte Netzwerke aus, deren Form und Verknüpfungsart ebenso variabel war. Insgesamt erschien das Neuritenwachstum anders als *in vivo* nicht zielgerichtet. Im Insektennervensystem sind die Neurone überwiegend unipolar. Die Somata liegen in der äußeren Rinde des Ganglions und ihre Neuriten treten im zentralen Neuropil miteinander in Verbindung (Strausfeld, 1976). Die frisch isolierten Neurone in der

Primärzellkultur beginnen ihr Wachstum im axotomierten Zustand. Physiologische Faktoren, die die Zellmorphologie bestimmen, fehlen und können somit *in vitro* keinen Beitrag zu zielgerichtetem Wachstum mehr leisten. Ungerichtetes Wachstum, wie es in der vorliegenden Zellkultur beobachtet wurde, ist die Folge (Cepok, 1999).

4.2. Geometrische Kontrolle des Wachstums

Um funktionale Netzwerke *in vitro* nachbilden zu können, ist es erforderlich, das Wachstum der kultivierten Zellen geometrisch kontrollieren zu können. Dazu bedarf es eines starken Kontrastes zwischen dem aufgetragenen zellattraktiven Protein (strukturiert mit dem gewünschten Netzwerkverlauf) und dem zellaversiven Untergrundsubstrat.

ConA, Laminin, und Poly-L-Lysin eignen sich gut als zellattraktive Substrate für Invertebratenneurone (Hayashi und Hildebrand, 1990; Lapied et al., 1993; Pinnock und Sattelle, 1987). Für Grillenneurone zeigten auch Glas, Polystyrol und Siliziumdioxid zellattraktive Eigenschaften (Schulte et al., 2005). Daher bestand die Notwendigkeit, ein zellaversives Substrat zu finden. Anders als beispielsweise bei Vertebratenneuronen (Vogt et al., 2003) war ein Standardsubstrat nicht ausreichend, um die Zelladhäsion und das Zellwachstum zu unterbinden. Durch das Aufbringen von großen Mengen ConA mittels inversem μ CP und die dadurch produzierten Konzentrationsgradienten entstand ein sichtbarer Kontrast zum Untergrundsubstrat. Das Wachstum der Zellen richtete sich an den ConA - Gradienten aus. Offenbar wirkte ConA als positionsbestimmender Faktor für die Neuriten von Grillenneuronen. In der Literatur ist beschrieben, dass ConA mit Acetylcholin-Rezeptoren interagiert (Arvanov et al., 1993; Messing et al., 1984). Es ist denkbar, dass ConA das Auswachsen der Neuriten durch Interaktion mit Acetylcholinrezeptoren beeinflusst. Diese Hypothese wird durch Befunde von Spira et al. (1987) unterstützt, die bei Gls der Schabe Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen neuritischer Regeneration und der Lokalisation von Acetylcholinrezeptoren fanden. Denkbar wäre auch eine Interaktion mit der Glykokalix. In der Insektenzellmembran werden rekombinante Glykoproteine exprimiert (Altmann et al., 1999). Glykoproteine enthalten häufig neben anderen Zuckerresten auch Mannose und Glukose (Varki et al., 1999). Da ConA spezifisch an Mannose und Glukose binden kann, liegt die Vermutung nahe, es handele sich bei der ConA - Zell Interaktion um die Bindung von membranständigen

Glykoproteinen an ConA. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Stern-PEG Schichten mit Laminin und Poly-L-Lysin bedruckt. Allerdings war in beiden Fällen der Proteinübertrag schlecht. Poly-L-Lysin ist ein sehr großes Protein. Vielleicht hindert die Konformation seiner Seitenketten die Reaktion mit dem Isocyanat der Stern-PEG Molekülen. Möglicherweise war aber auch die Proteinbenetzung des Stempels nicht optimal.

PEG war als zellaversives Substrat bereits in mehreren Fällen angewendet worden (Sanjana und Fuller, 2004, Suh et al., 2004). Diverse PEG-Modifikationen wurden auf ihre Tauglichkeit zum Aufbringen eines strukturierten Netzwerkusters getestet.

Der Ansatz, aminoterminalen PEG über einen Thiollinker an eine mittels Sputtern vorstrukturierte Goldoberfläche aufzubringen (Mayer et al., 2005), lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Teilweise adhärten die Zellkörper auf dem PEG-freien Streifen. In anderen Fällen schienen die Neuriten regelrecht von NH_2 -PEG angezogen zu werden (Abb. 12). Möglicherweise wurde mit dem angewendeten Verfahren keine geschlossene NH_2 -PEG-Schicht auf den Gold-Streifen erzielt. Oder aber die NH_2 -PEG-Schicht war zwar geschlossen, aber der Abstand der vertikal angeordneten linearen Molekülketten war zu groß (Abb. 39; Groll, 2004). In so einem Fall wäre es denkbar, dass die Zellen stellenweise an dem Untergrundsubstrat haften. Außerdem ist von Fuller und Sanjana gezeigt, dass Collagen auf lineares PEG gedruckt werden kann. Grillenneurone könnten in ihrer extrazellulären Matrix Collagen oder ähnliche Moleküle besitzen und aufgrund vergleichbarer Mechanismen am linearen PEG haften.

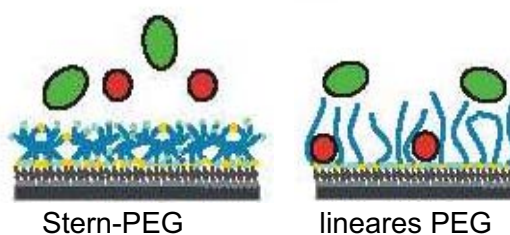


Abb. 39 Mechanismus der zellaversiven Wirkung verschiedener PEG-Modifikationen (Groll et al., 2005).

Das Stern-PEG hat gegenüber dem linearen PEG den Vorteil, dass es durch seine Konformation eine geschlossene Benetzung der beschichteten Oberfläche gewährleistet (Abb. 39). Zudem ist es mit reaktiven Isocyanatgruppen funktionalisiert, so dass zusätzliche chemische Modifikationen eingeführt werden können. Isocyanate

können in ihrer reaktiven Form (vor dem Kontakt mit Wasser) unter anderem kovalente Bindungen mit NH_2 -Gruppen eines Proteins eingehen (Groll et al., 2005).

Diese Tatsache wurde genutzt, um mittels klassischem μCP ConA auf Stern-PEG zu drucken. Mit dieser Methode konnten erstmalig geometrisch kontrollierte Netzwerke von Grillenneuronen erzeugt werden (Abb.22).

In der Literatur finden sich viele Publikationen zur Kultur von Insektenneuronen (Cayre et al., 1999; Hayashi und Hildebrand, 1990; Lapied et al., 1993), aber nur wenige haben sich mit der geometrischen Kontrolle des Wachstums von Insektenneuronen beschäftigt. Krull et al. (1994) konnten in gewissem Maße das Wachstum von Tabakschwärmerneuronen mit Hilfe des zellattraktiven Proteins Tenascin kontrollieren. Jedoch war die Mustertreue der Zellen ausgesprochen gering. Darüber hinaus fehlt die Kontrolle über das Wachstum einzelner Neuriten, wie es in dieser Arbeit erzielt werden konnte.

Unter den diversen Stempelmustern, die getestet wurden, zeigte sich ein dichtes Gittermuster wie in Abb. 19 (50 und 100 μm Knotenabstände) mit relativ kleinen Knoten und einer Liniendicke von 4-7 μm als optimal für die Kontrolle des Wachstums einzelner Neuriten (siehe Abb. 21). Durch den Abstand der Knoten zueinander fanden oftmals die Neuriten mehrerer Zellen morphologischen Anschluss. Wenn die Zelldichte zu niedrig gewählt wurde, bildeten Einzelzellen wie in Abb. 21 ein sehr breites Neuritenmuster aus. Lediglich die Anzahl der Netzwerke war stark reduziert. Lu et al. (2005) stellten ein so genanntes Yin-Yang Modell vor, welches besagt, dass die Ausschüttung reifer Neurotrophine die Überlebenswahrscheinlichkeit und das Wachstum benachbarter Zellen erhöht, während Proneurotrophine die Apoptose benachbarter Zellen auslösen. Sie postulieren kultivierte Zellen seien nur in einem guten Zustand, wenn die optimale Menge an Neurotrophenen vorhanden ist.

Wie auch bei Vertebraten spielen Gliazellen im Insektennervensystem beim Wachstum und Ausdifferenzieren eine große Rolle. Sie produzieren diffusionsfähige Schlüsselmoleküle und bilden auf ihrer Oberfläche membrangebundene Wachstumsfaktoren, die Axonwachstum modulieren können (Auld, 1999).

Die Grillenneurone waren auch bei geringer Aussaatdichte noch in der Lage, einen stark ausgedehnten Neuritenbaum zu erzeugen. Das deutet darauf hin, dass das Neuritenwachstum der Zellen nicht bzw. nicht stark von der Ausschüttung neurotropher Faktoren durch Nachbarneuronen oder Gliazellen abhängig war. Gegen diese Interpretation spricht die Beobachtung, dass Grillenneurone die Nähe von Gliazellen suchten, wenn diese vorhanden waren (siehe Abb. 29). Dieses Phänomen

könnte aber auch auf eine Bevorzugung der glialen extrazellulären Matrix vor ConA durch die Neurone zurückzuführen sein.

Für das Wachstum war die Zelldichte kein kritischer Parameter, weil durch die vorgegebene Struktur eine definierte Zelldichte nicht überschritten werden konnte und weil die Zellen offenbar von neurotrophen Faktoren der Nachbarzellen unabhängig waren. Das Ausplattieren von einem Terminalganglion auf zwei Glascoverslips mit oben erwähnten Gittermustern erwies sich als hinreichend für eine optimale Besetzung der freien Adhärenzfläche und damit eine zahlreiche Netzwerkbildung. Die Nervenzellen richteten bei dieser optimalen Zelldichte ihre Neuriten an den Linien aus, sowohl auf Gittermustern als auch auf unverzweigten Linien und bildeten sie im letztgenannten Fall sogar auf einer Länge bis zu 1 mm. Die Wachstumskontrolle der Neuriten war somit von der Geometrie des Proteinmusters weitgehend unabhängig.

Die Beobachtung, dass die Neurone ihr Wachstum oft an den Rändern des PDMS Stempelabdrucks ausrichteten, legte die Vermutung nahe, dass das ConA sich vermehrt an den Rändern der Stempelaussparung sammelte und dadurch eine unregelmäßige Verteilung des ConA am Musterrand entstand (siehe Abb. 31). Diese Vermutung wurde anhand von AFM-Messungen bestätigt, die eine Differenz von ca. 100 nm ergaben.

Auch beim inversen μ CP von Brilliant Blue markiertem ConA konnte anhand des Farbverlaufs eine starke Gradientenbildung nachgewiesen werden. Wie beim klassischen μ CP war eine Ausrichtung des neuronalen Wachstums an den ConA - Gradienten zu beobachten (Abb. 9). Offenbar ist der ConA – Gradient der entscheidende Faktor zur Beeinflussung des neuronalen Wachstums *in vitro*. Für andere Präparationen ist bereits beschrieben, dass Proteingradienten zum Neuritenguiding führen können (Isbister et al., 2003). Auf Stern-PEG konnte das inverse μ CP zur Gradientenerzeugung nicht genutzt werden. Die Grillenneurone wiesen nur stellenweise ein gerichtetes Wachstum auf. Durch die Verwendung von FITC gekoppeltem ConA während des Stempelns wurde erkennbar, dass sich das Protein durch Kapillarkräfte unter den Stempel gesogen haben musste und damit überall auf dem Glascoverslip verteilt war (vergleiche Abb. 18).

Auch auf den standardisiert hergestellten Oberflächen (ConA / Stern-PEG Protokoll siehe Abschnitt 3.2.1.3.) richteten sich die Neuriten in einigen Fällen nicht explizit an den Proteinverlauf. Die Ausschüttung neuronaler Wachstumsfaktoren durch benachbarte Zellen könnte eine mögliche Erklärung dafür liefern. Gegen diese Hypothese spricht, dass das Neuronenwachstum bei geringer Zelldichte von der Ausschüttung von Neurotrophen in Nachbarzellen unabhängig war. Ebenfalls eine

mögliche Erklärung wäre eine stellenweise ungleichmäßige Dicke der Stern-PEG Schicht bzw. Löcher in der Stern-PEG Schicht.

Auf manchen Substraten, besonders bei einzeln wachsenden Zellen, schien ein Ausläufer besonders dick und lang zu sein. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass es sich dabei um die Axone der Zellen handeln könnte. Dotti et al. 1988 postulierten, der zuerst ausgebildete und längste Neurit sei das Axon. Mit Hilfe von Map2-Antikörpern färbten sie Dendriten spezifisch und fanden ihre Hypothese bestätigt.

Auf den ConA / Stern-PEG Substraten wurden häufig Zellen mit extrem breit ausgedehnten Neuritenbaum beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das gestempelte ConA – Muster eventuell das Neuritenwachstum in der Zellkultur verstärkt. Das wäre ein großer Vorteil im Hinblick auf die Netzbildung aus definierten Schaltkreisen. Denn ein verstärktes Wachstum würde auch die Wahrscheinlichkeit der Synapsenbildung zwischen den Neuronen erhöhen.

Rattencortexneurone, die auf ConA / Stern-PEG Oberflächen ausgesät wurden, bestätigten die musterinduzierende Eigenschaft sowie die Biokompatibilität der gewählten Materialien. Es zeigte sich, dass die Cortex-Neurone deutlich dickere Neuriten bildeten, als auf Standardsubstraten (Abb. 25 und Abb. 26). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass ConA einen wachstumsstimulierenden Effekt auf neuronale Ausläufer hat. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll wurde auch bei Neuronen aus dem metathorakalem Ganglion von *Locusta migratoria* erfolgreich zur geometrischen Kontrolle des neuronalen Wachstums eingesetzt.

Die Analyse der ConA / Stern-PEG Oberflächen mit dem REM zeigte sehr deutlich den Übergang zwischen Stern-PEG und ConA. Das ConA war dem Stern-PEG klar erkennbar aufgelagert, jedoch ergab die Bildqualität kein detailliertes Höhenprofil der ConA – Schicht. Die REM-Charakterisierung ermöglichte eine gute Übersicht über das gesamte Substrat, ist aber eine zweidimensionale Messmethode (Barkay, Shapira, 2005). Die erzeugten Bilder vermitteln einen Tiefeneindruck und sollten nur als grobe Einschätzung der Größenordnung verwendet werden. Durch die Nutzung von AFM im Tapping-Modus wurde die Probe weder aufgeladen noch erhitzt und verblieb so weitestgehend in ihrem ursprünglichen Zustand. Daher konnte mit dem AFM das Höhenprofil der hergestellten Oberflächen zuverlässig bestimmt werden. Beide Messmethoden, die zur Untersuchung der Topologie der Oberflächen benutzt wurden, nutzen verschiedene physikalische Eigenschaften der Oberflächen und ergänzten sich deswegen sehr gut.

4.3. Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen mit Hilfe der whole-cell Patch-Clamp Technik dienten der Überprüfung der Funktionalität der kultivierten Neurone auf homogenen und auf strukturierten Oberflächen. Außerdem erlaubten sie eine Aussage über die Qualität der Zellkultur und die Biokompatibilität der verwendeten Materialien.

Das ermittelte Membranruhepotential von $-45,3 \pm 7,8$ mV (siehe Abschnitt 3.3.) lag in einer Größenordnung, die mit Literaturwerten vergleichbar ist. Kloppenburg und Hörner (1998) lieferten für das Membranpotential von identifizierten Riesenneuronen der Grille unter vergleichbaren Zellkulturbedingungen zwar keinen expliziten Mittelwert, gaben jedoch eine Schwankungsbreite von -40 mV bis -60 mV an. In dieser Arbeit lag die Schwankungsbreite zwischen -30 mV bis -64 mV. In intakten Ganglien wurden vergleichbare Werte ermittelt (Heblich und Hörner, 1998; Meusen et al., 1997).

Im Current-Clamp Modus konnten drei verschiedene Zelltypen entsprechend ihrer Antwort auf Applikation von Strompulsen mit maximal 1 nA Amplitude unterschieden werden: ca. 24% aller untersuchten Neurone waren non spiker, 39% single spiker und 37% waren burster (Abschnitt 3.3.).

Bei Rieseninterneuronen der Grille ist bekannt, dass *in vivo* nur wenige Zellen zur Ausbildung von Aktionspotentialen am Soma stimuliert werden können (Murphey et al., 1973; Murphey et al., 1977; Meusen et al., 1997). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei den non spikern evtl. um solche Rieseninterneurone handeln könnte. Dagegen sprechen jedoch die Befunde von Kloppenburg und Hörner (1998), die mit Hilfe von Backfill-staining-Techniken zeigen konnten, dass Rieseninterneurone in Zellkultur sehr häufig APs ausbilden. Außerdem wurde von Goodman und Heitler (1979) gezeigt, dass Colchicin-Behandlung und Axotomie zu AP ausbildenden Somata führte. Intrazelluläre Ableitungen zeigen, dass wahrscheinlich die Mehrzahl der Neurone in Insektenganglien APs nur auf den Axonen oder in der AP generierenden Zone, nicht aber auf dem Soma direkt auslösen (Hoyle und Burrows, 1973). Nimmt man all diese Befunde zusammen und berücksichtigt, dass die Zelldissoziation eine Form von Axotomie ist, ist die Beurteilung, inwieweit das *in vitro* gefundene Verteilungsmuster die *in vivo* Situation widerspiegelt, schwierig.

Die Fähigkeit der GI, Aktionspotentiale mit einer großen Amplitude (von über 50 mV) zu generieren, weist auf Natrium- und / oder Calciumkanäle am Zellsoma hin. *In vivo*

wurden allerdings niedrigere AP-Amplituden gemessen, welche für eine AP-Weiterleitung von außerhalb des Zellsomas sprechen. Es scheint also einen Unterschied zwischen den Antwortcharakteristika *in vitro* und *in vivo* zu geben. In dieser Arbeit identifizierte single spiker wiesen eine durchschnittliche AP-Amplitude von 25 ± 9 mV mit einer halbmaximalen Breite von $1,0 \pm 0,2$ ms auf. Bei Cepok (1999) wurden APs nur bei Neuronen registriert, die einen Natriumeinstrom von mindestens 10 nA hatten. In den hier vorliegenden Messungen lagen die Einwärtsströme aber deutlich unterhalb dieses Wertes, nämlich im Bereich zwischen 0,3 und 3 nA bei den single spikern und zwischen 0,4 und 6 nA bei den burstern. Das liegt vermutlich daran, dass die Einwärtsströme nicht pharmakologisch isoliert wurden, so dass ein Großteil der Einwärtsströme durch Auswärtsströme maskiert wurde. Darüber hinaus könnte dieser Befund ein Hinweis auf passiv ausgebreitete APs sein, wie sie *in vivo* gezeigt wurden (Heblich und Horner, 1998; Kohstallschnell und Gras, 1994; Murphey et al., 1977).

Die mittlere AP-Amplitude bei burstern lag bei 52 ± 21 mV mit einer AP Breite $1,3 \pm 0,5$ ms. Dieser Wert ist mit Literaturangaben vergleichbar.

Kloppenburg und Hörner (1998) isolierten unter VC-Bedingungen einwärts gerichtete Natriumströme, die ab einem Haltepotential von etwa -30 mV aktivierten und Calciumströme, die zwischen -40 mV und -30 mV aktivierten. Die I/V-Kennlinien, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, zeigen eine Aktivierung einwärts gerichteter Ströme in einem Bereich von etwa -50 mV (burster). Diese Verschiebung des Aktivierungspotentials in den negativen Bereich beruht sicherlich auf der fehlenden pharmakologischen Isolierung der Einwärtsströme (siehe oben). Einwärts gerichtete Stromkomponenten könnten von Auswärtsströmen überlagert worden sein. Der auswärts gerichtete Kaliumstrom von kultivierten GIs besteht aus einer schnellen, transienten und einer langsamen, persistenten Komponente (Kloppenburg und Hörner, 1998). Bei den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die langsame, persistente Komponente immer nachgewiesen werden (vgl. Abb. 33, Abb. 34), während die schnellere, transiente Komponente sehr selten auftrat (Daten nicht gezeigt).

Die I/V – Kennlinie für die Einwärtsströme bei non spikern verläuft flach und schwankt um eine Stromamplitude von 0 nA. Dies deutet auf die vollständige Abwesenheit von Einwärtsströmen vermittelnden Kanälen hin.

Die single spiker haben einen signifikant höheren Auswärtsstrom als die burster. Dieser Auswärtsstrom könnte die Aktivierung von Einwärtsströmen verlangsamen und so die Anzahl der auslösbaren APs auf 1 begrenzen.

Die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der kultivierten Neurone sind im Einklang mit Literaturwerten, jedoch sind detaillierte pharmakologische Untersuchungen notwendig, um diese näher zu charakterisieren. Die elektrophysiologische Analyse der Zellen zeigte keinen Effekt der Untergrundsstrate auf die morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone.

4.4. Synaptische Verbindungen zwischen Nervenzellen

Zellen eines neuronalen Netzwerkes müssen, um neuronale Informationen zu verarbeiten, physiologisch verknüpft sein. Für Vertebraten ist schon vielfach eine Ausbildung chemischer Synapsen in Zellkulturen gezeigt worden (Vogt et al., 2005; Matsuzawa et al., 2000). Die spezifische Bildung von Synapsen hängt von einer Vielzahl molekularer Interaktionen zwischen Prä- und Postsynapse ab. Die Anzahl an chemischen Synapsen auf vorstrukturierten Oberflächen *in vitro* ist vergleichbar mit jener auf homogenen Oberflächen. Reziproke Verknüpfungen zwischen Zellen nehmen in der Zellkultur sogar zu (Vogt et al., 2005; Wheeler et al., 1999).

Informationen werden im ZNS von Insekten über chemische und elektrische Synapsen weitergeleitet (Watson und Schürmann 2002). In homogenen Zellkulturen von *Locusta migratoria* sind neben chemischen auch elektrische Synapsen elektrophysiologisch nachgewiesen worden (Weigel, 2005). In neuronalen Zellkulturen von Grillen wurden bisher ausschließlich chemische Synapsen auf homogenen Oberflächen gezeigt (Schulte et al., 2005). In dieser Arbeit wurde erstmalig die Existenz von Synapsen zwischen Insektenneuronen innerhalb geometrisch kontrollierter Netzwerke demonstriert. Diese Synapsen konnten eindeutig als chemische Synapsen identifiziert werden. Während die Transmitterfreisetzung aus der Präsynapse und die Transmitterbindung an Rezeptoren der Postsynapse 0,5 – 1 ms benötigt, erfolgt die Signalübertragung in elektrischen Synapsen fast verzögerungsfrei. Weil elektrische Synapsen eine direkte morphologische Verknüpfung zwischen dem Cytoplasma beider Zellen darstellen, können sich die elektrische Signalen nahezu ungehindert in beiden Zellen ausbreiten, d.h. die Signalform ist in beiden Zellen gleich und die Übertragung funktioniert in beide Richtungen (Kandel et al., 2000). Die Signalformen der Prä- und Postsynapse waren jedoch unterschiedlich in Amplitude und zeitlichem Verlauf (siehe Abb. 36). Außerdem

war die Signalfortleitung nicht umkehrbar. Somit konnten die vorliegenden Synapsen anhand von drei Charakteristika als chemische Synapsen identifiziert werden: Latenzzeit, Signalform und Umkehrbarkeit. Genauere pharmakologische Charakterisierungen hinsichtlich der ausgeschütteten Neurotransmitter und der postsynaptischen Rezeptorausstattung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von Substraten, welche ein induziertes Musterwachstum von Neuronen aus dem Terminalganglion der Grille ermöglicht. Bislang fehlte ein zuverlässiges Protokoll zur geometrischen Kontrolle von Insektenneuronen. Mit dieser Arbeit gelang es erstmalig, nicht nur die Position der Zellsomata sondern auch das Neuritenwachstum nach vorgegebenen Mustern auszurichten. Mit Hilfe von diversen PEG-Modifikationen und chemikalischen bzw. softlithographischen Methoden wurde versucht, ein geeignetes zellrepulsives Substrat herzustellen. Die grundlegende Idee bestand darin, zellrepulsive und zellattraktive Oberflächenmaterialien miteinander zu kombinieren.

Als zellrepulsive Materialien wurden lineares NH_2 -PEG und Stern-PEG getestet. Die Linker zwischen Untergrundsubstrat (Glas bzw. SiO_2) und linearem NH_2 -PEG waren APTES und DTSP. Beide Ansätze führten nicht zu dem erwünschten Ergebnis. Die kontrollierte geometrische Musterbildung gelang schließlich, indem ConA mittels μCP auf noch weiches Stern-PEG gedruckt wurde. Sowohl die Zelladhärenz als auch das Neuritenwachstum entlang definierter Strukturen waren so gewährleistet. Für das Zellwachstum war ein Gittermuster mit ca. 50 – 70% der Somagröße starken Knoten und einer Liniendicke von 4 - 7 μm optimal.

Durch Patch-Clamp Experimente wurden elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone untersucht. Dabei konnten die Neurone in drei Antworttypen unterteilt werden: burster, single spiker, non spiker. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen homogenen und kontrollierten Zellen hinsichtlich der Membranpotentiale und Membranströme.

Mit Hilfe von Double Patch-Clamp Experimenten konnten erstmalig chemische Synapsen in geometrisch kontrollierten Netzwerken gezeigt werden.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Übersicht der Interneurone im Terminalganglion der Grille. (Quelle: Jacobs und Murphey, 1987).....	2
Abb. 2 Softlithographische Methoden zur Erstellung von Mustern (nach Xia und Whitesides, 1998) modifiziert).....	4
Abb. 3 Schematischer Aufbau des Patch-Clamp Standes. (Quelle: Weigel S.).....	12
Abb. 4 Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.	15
Abb. 5 Schematischer Aufbau eines AFM. (Quelle: Universität Beyreuth)	19
Abb. 6 Grillenneurone auf ConA DIV 7 / bzw. DIV 8.....	25
Abb. 7 Homogene Netzwerke von Grillenneuronen.....	25
Abb. 8 Grillenneuron auf einem ConA - beschichteten Glascoverslip (DIV 8).	26
Abb. 9 Grillenneuron auf ConA - Brilliant Blue Linienmuster (DIV 7).	27
Abb. 10 Grillenneurone auf ConA - Brilliant Blue Streifenmuster (DIV5).	28
Abb. 11 Grillenneuron auf ConA - Streifen (DIV 7 bzw. DIV 5).	29
Abb. 12 Grillenneurone auf Streifenmuster aus NH ₂ -PEG auf Gold bzw. SiO ₂ (DIV 2). ...	30
Abb. 13 Grillenneurone auf Streifenmuster aus NH ₂ -PEG auf Gold bzw. SiO ₂ (DIV 2). ...	30
Abb. 14 Kreuzvernetzungsreaktion von Stern-PEG Molekülen in wässriger Umgebung..	33
Abb. 15 Streifenmuster (100 µm breit mit 100 µm Abstand) aus ConA auf Stern-PEG, aufgebracht mittels µCP (DIV 1).	35
Abb. 16 Streifenmuster (50 µm breit mit 50 µm Abstand) aus ConA auf Stern-PEG, aufgebracht mittels µCP (DIV 6).	35
Abb. 17 Schematische Darstellung einer Stern-PEG Schicht mit aufgedruckten ConA - Molekülen.....	36
Abb. 18 FITC-gekoppeltes ConA auf Stern-PEG.....	37
Abb. 19 Konfokaler Laser Scan einer Stern-PEG / FITC-ConA-Oberfläche.	37
Abb. 20 µCP mit SDS hydrophilisiertem (a) bzw. unbehandeltem Stempel (b).	38
Abb. 21 Phasenkontrastmikroskopie von Grillenneuronen (DIV 7), die auf einer Stern-PEG / ConA Oberfläche ausplattiert wurden.....	41
Abb. 22 Grillenneurone auf Gittermustern aus ConA auf Stern-PEG an DIV 7(A) und DIV 10 (B).	42
Abb. 23 Netzwerk aus Grillenneuronen (DIV 6).	42
Abb. 24 Gittermuster aus ConA auf Stern-PEG aufgebracht mittels µCP (DIV 9).	43
Abb. 25 Cortexzellen auf einem ConA Gitter auf Stern-PEG (DIV 3).	44
Abb. 26 Cortexzellen auf einem P-ECM Gitter auf Polystyrol (DIV 3).....	44
Abb. 27 Übergang zwischen ConA und Stern-PEG Unterlage an einem Knoten des ConA-Gittermusters.....	45
Abb. 28 Grillenneurone auf einem ConA - Gittermuster auf Stern-PEG.	46
Abb. 29 Grillenneurone auf ConA / Stern-PEG Gittermuster (DIV 7).	46
Abb. 30 AFM Analyse eines 1 µm breiten ConA - Streifens mittels µCP auf Stern-PEG aufgebracht, gemessen mit dem AFM.	47

Abb. 31 Analyse des Höhenprofils von ConA - Streifen auf Stern-PEG.	48
Abb. 32 Elektrophysiologische Messungen zur Unterscheidung der drei Zelltypen.	50
Abb. 33 I/V - Kennlinie: Vergleich der auswärts gerichteten Strömen der drei Zellsubtypen.	51
Abb. 34 I/V - Kennlinie: Vergleich der einwärts gerichteten Ströme der drei Zelltypen.....	52
Abb. 35 Zwei durch eine chemische Synapse verbundene Zellen auf einem ConA Gittermuster auf Stern-PEG.....	53
Abb. 36 Double Patch-Clamp Ableitung der in Abb. 35 gezeigten Neurone im CC-Modus.	55
Abb. 37 Bestimmung der Latenzzeit.	55
Abb. 38 Double Patch-Clamp Ableitung der in Abb. 35 gezeigten Neurone im VC-Modus.	56
Abb. 39 Mechanismus der zellaversiven Wirkung verschiedener PEG-Modifikationen (Groll et al., 2005).	59

6. Literaturverzeichnis

Reference List

- Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH, Marz L. 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* 16:109-123.
- Arvanov VL, Tsai MC, Walker RJ, Ayrapietian SN. 1993. Interaction of Concanavalin-A and Wheat-Germ-Agglutinin with Helix Acetylcholine-Receptors. *Brain Research* 615:252-258.
- Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. 1987. Optical Trapping and Manipulation of Single Cells Using Infrared-Laser Beams. *Nature* 330:769-771.
- Auld V. 1999. Glia as mediators of growth cone guidance: studies from insect nervous systems. *Cell Mol Life Sci* 55:1377-1385.
- Binning GuQC. 1985. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56:930-933.
- Bodnar DA, Miller JP, Jacobs GA. 1991. Anatomy and physiology of identified wind-sensitive local interneurons in the cricket cercal sensory system. *J Comp Physiol [A]* 168:553-564.
- Bradford MM. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Cayre M, Buckingham SD, Yagodin S, Sattelle DB. 1999. Cultured Insect Mushroom Body Neurons Express Functional Receptors for Acetylcholine, GABA, Glutamate, Octopamine, and Dopamine. *J Neurophysiol* 81:1-14.
- Cepok S. Elektrophysiologische Untersuchungen an Interneuronen des Terminalganglions der Grille, *Gryllus bimaculatus*. 1999. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Csucs G, Kunzler T, Feldman K, Robin F, Spencer ND. 2003. Microcontact printing of macromolecules with submicrometer resolution by means of polyolefin stamps. *Langmuir* 19:6104-6109.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The Establishment of Polarity by Hippocampal-Neurons in Culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Edwards JS, Palka J. 1974. Cerci and Abdominal Giant Fibers of House Cricket, *Acheta-Domesticus* .1. Anatomy and Physiology of Normal Adults. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 185:83-&.
- Ehrlicher A, Betz T, Stuhmann B, Koch D, Milner V, Raizen MG, Kas J. 2002. Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16024-16028.
- Gnatzy W, Schmidt K. 1971. [The fine structure of the sensory hairs on the ceroi of *Gryllus bimaculatus* Deg. (Saltatoria, Gryllidae). I. Filamentous and club-shaped hairs]. *Zellforsch Mikrosk Anat* 122:190-209.
- Goodman CS, Heitler WJ. 1979. Electrical properties of insect neurones with spiking and non-spiking somata: normal, axotomized, and colchicine-treated neurones. *J Exp Biol* 83:95-121.

Gras H, Kohstall D. 1998. Current injection into interneurons of the terminal ganglion modifies turning behaviour of walking crickets. *Journal of Comparative Physiology A- Sensory Neural and Behavioral Physiology* 182:351-361.

Groll J. Specific and directed biomolecular recognition and star-PEG coatings. 2004. Ref Type: Thesis/Dissertation

Groll J, Ameringer T, Spatz JP, Moeller M. 2005. Ultrathin coatings from isocyanate-terminated star PEG prepolymers: Layer formation and characterization. *Langmuir* 21:1991-1999.

Harrison J, Leech C, Katz J, Sattelle D. 1990. Embryonic and adult neurones of the housefly (*Musca domestica*) in culture. *Tissue Cell* 22(3):337-47.

Hayashi JH, Hildebrand JG. 1990. Insect olfactory neurons in vitro: morphological and physiological characterization of cells from the developing antennal lobes of *Manduca sexta*. *J Neurosci* 10(3):848-59.

Heblich R, Horner M. 1998. In: Amine-induced modulations of the giant fibre pathway in the cricket terminal ganglion. *Göttingen Neurobiology Report* 2.

Heida T, Rutten WLC, Marani E. 2001. Dielectrophoretic trapping of dissociated fetal cortical rat neurons. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 48:921-930.

Heusslein R, Gnatzy W. 1987. Central Projections of Campaniform Sensilla on the Cerci of Crickets and Cockroaches. *Cell and Tissue Research* 247:591-598.

Hoeller M. Biophysikalische Charakterisierung des Zell-Transistor-Kontaktes. 2005. Ref Type: Thesis/Dissertation

Hoyle G, Burrows M. 1973. Neural Mechanisms Underlying Behavior in Locust *Schistocerca-Gregaria* .1. Physiology of Identified Motorneurons in Metathoracic Ganglion. *Journal of Neurobiology* 4:3-41.

Isbister CM, Mackenzie PJ, To KCW, O'Connor TP. 2003. Gradient steepness influences the pathfinding decisions of neuronal growth cones in vivo. *J Neurosci* 23:193-202.

Jacobs GA, Murphey RK. 1987. Segmental Origins of the Cricket Giant Interneuron System. *Journal of Comparative Neurology* 265:145-157.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of Neural Science. New York:McGraw-Hill.

Kloppenburger P, Hörner M. 1998. Voltage-activated currents in identified giant interneurons isolated from adult crickets *Gryllus bimaculatus*. *J Exp Biol* 201:2529-2541.

Kohstallschnell D, Gras H. 1994. Activity of Giant Interneurons and Other Wind-Sensitive Elements of the Terminal Ganglion in the Walking Cricket. *J Exp Biol* 193:157-181.

Kollensperger G, Friedbacher G, Krammer A, Grasserbauer M. 1999. Application of atomic force microscopy to particle sizing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 363:323-332.

Krull CE, Oland LA, Faissner A, Schachner M, Tolbert LP. 1994. In vitro analyses of neurite outgrowth indicate a potential role for tenascin-like molecules in the development of insect olfactory glomeruli. *J Neurobiol* 25:989-1004.

- Lapied B, Tribut F, Sinakevitch I, Hue B, Beadle DJ. 1993. Neurite regeneration of long-term cultured adult insect neurosecretory cells identified as DUM neurons. *Tissue and Cell* 6:893-906.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 6:603-614.
- Matsuzawa M, Tabata T, Knoll W, Kano M. 2000. Formation of hippocampal synapses on patterned substrates of a laminin-derived synthetic peptide. *European Journal of Neuroscience* 12:903-910.
- Mayer D, Ataka K, Heberle J, Offenhausser A. 2005. Scanning probe microscopic studies of the oriented attachment and membrane reconstitution of cytochrome c oxidase to a gold electrode. *Langmuir* 21:8580-8583.
- McDowell TS. 2004. Exogenous nerve growth factor attenuates opioid-induced inhibition of voltage-activated Ba²⁺ currents in rat sensory neurons. *Neuroscience* 125:1029-1037.
- Mendenhall B, Murphey RK. 1974. Morphology of Cricket Giant Interneurons. *Journal of Neurobiology* 5:565-580.
- Merz M. Topologically Defined Neuronal Networks Controlled by Silicon Chips. p. 124. 2004. Technische Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Merz M, Fromherz P. 2005. Silicon chip interfaced with a geometrically defined net of snail neurons. *Advanced Functional Materials* 15:739-744.
- Messing A, Bizzini B, Gonatas NK. 1984. Concanavalin-A Inhibits Nicotinic Acetylcholine-Receptor Function in Cultured Chick Ciliary Ganglion Neurons. *Brain Research* 303:241-249.
- Meusen H, Heblich R, Horner M, Schurmann F. 1997. Aminergic modulation of wind-sensitive giant-interneurons in the cricket terminal ganglion. *Verh dt zool Ges* 90.
- Mohanty SK, Sharma M, Panicker MM, Gupta PK. 2005. Controlled induction, enhancement, and guidance of neuronal growth cones by use of line optical tweezers. *Optics Letters* 30:2596-2598.
- Murphey RK, Palka J, Edwards JS. 1973. Effects of Sensory Deprivation on Geometry of An Identified Giant Interneuron in Crickets. *American Zoologist* 13:1302.
- Murphey RK, Palka J, Hustert R. 1977. Cercus-To-Giant Interneuron System of Crickets .2. Response Characteristics of 2 Giant Interneurons. *Journal of Comparative Physiology* 119:285-300.
- Murphey RK, Walthall WW, Jacobs GA. 1984. Neurospecificity in the Cricket Cercal System. *J Exp Biol* 112:7-25.
- Palka J, Olberg R. 1977. Cercus-To-Giant Interneuron System of Crickets .3. Receptive-Field Organization. *Journal of Comparative Physiology* 119:301-317.
- Pfahler C, LakesHarlan R. 1997. Responses of insect neurones to neurotrophic factors in vitro. *Naturwissenschaften* 84:163-165.
- Pinnock RD, Sattelle DB. 1987. Dissociation and maintenance in vitro of neurones from adult cockroach (*Periplaneta americana*) and housefly (*Musca domestica*). *J Neurosci Methods* 20:195-202.

- Ridgway RL, Syed NI, Lukowiak K, Bulloch AGM. 1991. Nerve Growth-Factor (Ngf) Induces Sprouting of Specific Neurons of the Snail, *Lymnaea-Stagnalis*. *Journal of Neurobiology* 22:377-390.
- Roeder KD. 1948. Organization of the Ascending Giant Fiber System in the Cockroach (*Periplaneta Americana*). *Journal of Experimental Zoology* 108:243-261.
- Sanjana NE, Fuller SB. 2004. A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *J Neurosci Methods* 136:151-163.
- Schoch K, Stevenson P, Schildberger K. Anatomie und Immunocytochemie aufsteigender Interneurone der Grille, *Gryllus bimaculatus*. 2005. Ref Type: Data File
- Schulte P., Weigel S, Böcker-Meffert S, Offenhäusser A. 2005. In: Functional networks of cricket neurons of the terminal ganglion in vitro, Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society /30th Goettingen Neurobiology Conference, *Neuroforum*.1 Suppl.: 342B.
- Shimozawa T, Murakami J, Kumagai T. 2003. Cricket Wind Receptors: Thermal Noise for the Highest Sensitivity Known. In: Barth, Humphrey, Secomb, editors. *Sensors and sensing in biology and engineering*. Springer Wien NewYork. p. 145-157.
- Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DIC, Whitesides GM, Ingber DE. 1994. Engineering Cell-Shape and Function. *Science* 264:696-698.
- Smith KCA, Oatley CW. 2004. The scanning electron microscope and its fields of application. pp. 111-125.
- Spira M, Zeldes D, Hochner B, Dormann A. 1987. The effects of microenvironment on the redifferentiation of regenerating neurones: neurite architecture, acetylcholine receptors and Ca²⁺ channel distribution. *J Exp Biol* 132:111-31.
- Strausfeld NJ. 1976. Atlas of an insect brain. Berlin, Heidelberg, New York:Springer Verlag.
- Suh KY, Seong J, Khademhosseini A, Laibinis PE, Langer R. 2004. A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials* 25:557-563.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. 1999. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogt A. Synaptic Connectivity in Micropatterned Networks of Neuronal Cells. p. 182. 2003. Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Vogt AK, Lauer L, Knoll W, Offenhäusser A. 2003. Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnol Prog* 19:1562-1568.
- Watson AH, Schurmann FW. 2002. Synaptic structure, distribution, and circuitry in the central nervous system of the locust and related insects. *Microsc Res Tech* 56:210-226.
- Westin J, Langberg JJ, Camhi JM. 1977. Responses of Giant Interneurons of Cockroach *Periplaneta-Americana* to Wind Puffs of Different Directions and Velocities. *Journal of Comparative Physiology* 121:307-324.

Wheeler BC, Corey JM, Brewer GJ, Branch DW. 1999. Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture. *J Biomech Eng* 121:73-78.

Wildering WC, Lodder JC, Kits KS, Bulloch AGM. 1995. Nerve growth factor (NGF) acutely enhances high-voltage activated calcium currents in molluscan neurons. *J Neurophysiol* 74:2778-2781.

Xia YN, Whitesides GM. 1998. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 28:153-184.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Mitgliedern der ISG-2 BE Gruppe für die nette Arbeitsatmosphäre und für die vielen Tipps und anregenden Diskussionen bedanken. Besonders danke ich Petra Schulte für die gute und nette Betreuung, viel Geduld und eine sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Offenhäusser danke ich für die Möglichkeit meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu machen und ebenfalls für seine guten Tipps und seine Hilfe.

Marko Banzet und Regina Stockmann danke ich für die Herstellung der Wafer, ohne die die neuronalen Netzwerke nicht hätten entstehen können.

Torsten Wilms danke ich für seine Unterstützung im Labor und seine liebevolle Pflege der Grillen.

Natürlich waren auch viele weitere Mitglieder der ISG2-BE Gruppe wie Dirk Meyer, Stefan Weigel, Simone Böcker-Meffert, Sven Ingebrandt, Günter Wrobel, Daniel Schwaab, Yinhua Han und Rita Helpenstein mit kleinen und großen Beiträgen an dieser Arbeit beteiligt. Ihnen allen auch einen herzlichen Dank.

Peter Gasteier bin ich besonders zu Dank verpflichtet, weil er mir über 3 Monate Woche für Woche die Substrate vorbereitet hat und dafür viel seiner kostbaren Zeit geopfert hat. Ich hoffe unsere Zusammenarbeit geht erfolgreich weiter.

Kay Viehweger danke ich für die Korrekturen in letzter Minute...

Vielen Dank auch an die Menschen, die mir während dieser Zeit privat beigestanden haben. Meinen Eltern und meinen Geschwistern Kathi und Paul danke ich sehr für die seelische Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Marcus, der die ganze Zeit meine Hochs und Tiefs mitgemacht hat und mir ab und zu einen kleinen „Ruck“ geben musste. Danke, dass Du da warst.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4230
Oktober 2006
ISSN 0944-2952